Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor Professor Dr. W. Schneider
des Zentralinstituts für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PERSISTENZ CYTOTOXISCHER HLA-ANTIKÖRPER BEI SCHWANGEREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von Heimo Haug
aus Calw

1978

Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor Professor Dr. W. Schneider
des Zentralinstituts für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PERSISTENZ CYTOTOXISCHER HLA-ANTIKÖRPER BEI SCHWANGEREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von Heimo Haug
aus Calw

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H.-E. Hoffmeister
Berichterstatter: Professor Dr. W. Schneider

Meinen Eltern

in Dank gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0084

INHALTSVERZEICHNIS :

1. EINFÜHRUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1. Geschichtlicher Rückblick

1.2. Genetik

1.2.1. Entwicklung genetischer Vorstellungen

1.2.2. Aktuelles genetisches Konzept

1.2.2.1. Formalgenetik

1.2.2.2. Nomenklatur

1.2.3. Vererbungsmodus

1.2.4. Charakteristische Besonderheiten der Vererbung

1.2.4.1. Kopplungsungleichgewicht

1.2.4.2. Rekombination

1.2.4.3. Homo- und Heterozygotie, Gene dose effect

1.3. Antigene

1.3.1. Leukozytäre Antigene

1.3.2. HLA-Antigene als spezielle leukozytäre Antigene

1.3.2.1. Lokalisation und Chemie

1.3.2.2. Antigenität - Immunogenität

1.4. Antikörper des HLA - Systems

1.4.1. Charakterisierung

1.4.2. Kreuzreaktion

1.4.3. Gewinnung von Testseren

1.5. Nachweismethoden

1.5.1. - für Antigene

1.5.2. - für Antikörper

1.5.3. Vergleich der Methoden

1.6. Immunisierung und Konsequenzen

1.6.1. Möglichkeiten einer Immunisierung

1.6.1.1. Transfusion

1.6.1.2. Organtransplantation

1.6.1.3. Freiwillige Immunisierung
1.6.1.4. Schwangerschaft
1.6.1.4.1. Ursachen und Ablauf der Immunisierung
1.6.1.4.2. Zeitpunkt der Immunisierung
1.6.1.4.3. Häufigkeit von HLA-Antikörpern zum Zeitpunkt der Geburt
1.6.1.4.4. Persistenz der HLA-Antikörper
1.6.1.4.5. Konsequenzen einer Sensibilisierung für die Schwangerschaft

1.7. Fragestellung

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Material
2.1.1. Untersuchungsgut
2.1.2. Fragebögen
2.1.3. Testzellen
2.1.4. Reagentien und Material
2.1.4.1. für die Isolierung von Lymphozyten
2.1.4.2. für die NIH-Standardmethode

2.2. Methode
2.2.1. Isolierung der Testzellen aus defibriniertem Blut
2.2.1.1. Defibrination
2.2.1.2. Isolierung
2.2.2. Konservierung der Testzellen
2.2.3. Auftauen der Testzellen
2.2.4. NIH-Standardtechnik
2.2.5. Titeruntersuchungen
2.2.6. Dokumentation der Ergebnisse
2.2.7. Statistische Berechnungen

3. ERGEBNISSE

3.1. Qualitativer Antikörpersuchtest

3.2. Quantitative Titeruntersuchungen

3.3. Zeit zwischen den Untersuchungen

3.4. Einfluß auf die Persistenz und Auswirkungen der Persistenz

3.4.1. Spezifität der persistierenden Antikörper

3.4.2. Vergleich der Persistenz (1972-76) mit der Antigenität (1972)

3.4.3. Veränderungen des Antikörperspektrums

3.4.4. Zwischenzeitlicher Antigenkontakt

3.4.5. Einfluß von Schwangerschaften auf die Spezifität der persistierenden Antikörper

3.4.6. Einfluß der Anzahl der Schwangerschaften auf die Häufigkeit der Persistenz

3.4.7. Abhängigkeit der Persistenzhäufigkeit vom Alter der Mutter

3.5. Differenzierung der Schwangerschaften

3.6. Einfluß der Persistenz von Antikörpern auf Aborthäufigkeit und Geschlechtsverteilung

3.6.1. - auf Aborthäufigkeit

3.6.2. - auf Geschlechtsverteilung

3.7. Charakteristika des HLA-Systems im Vergleich zum Rh-System als Beispiel

4. DISKUSSION

4.1. Persistenz cytotoxischer HLA-Antikörper

4.2. Vorstellungen über die Ursachen der Persistenz

4.3. Untersuchungen im Zusammenhang mit der Persistenz

4.3.1. Anzahl der Schwangerschaften

4.3.2. Alter der Mutter

4.3.3. Spezifität der Antikörper

4.3.4. Antikörpertiter

4.4. Konsequenzen der Antikörperpersistenz

4.4.1. - für die Mutter

4.4.2. - für das Kind

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG UND FRAGESTELLUNG.

Das HLA-System (Histokompatibility Locus Antigen, bzw. Human Leukocyte Antigen) ist ein komplexes immungenetisches System, dem ein Großteil der leukozytären Antigene angehört. Dieser Genkomplex stellt das Haupthistokompatibilitäts-System des Menschen dar und weist eine große Ähnlichkeit mit entsprechenden Systemen in allen bisher untersuchten Säugetieren auf (79). Er besteht aus einer Reihe von eng gekoppelten Loci und codiert die streng spezifische Antigenzusammensetzung von Gewebe und Zellen eines jeden Individuums.

1.1. Geschichtlicher Rückblick.

Einer der wichtigen Impulse für die Erforschung des HLA-Systems war die Erkenntnis, daß die Abstoßung übertragener Organe ein immunologisches Phänomen im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion darstellt (Medewar 1946) (58). Bei der intensiven Untersuchung der in dieser Reaktion beteiligten Antigene stellte sich heraus, daß für die Gewebeverträglichkeit neben dem ABO-Blutgruppensystem leukozytäre Antigene von besonderer Bedeutung sind. Im Rahmen von febrilen Transfusionsreaktionen, neonataler Neutropenie und Autoimmunerkrankungen (55, 66) waren zwar leukozytäre Merkmale schon erwähnt worden, jedoch wurde die Forschung wegen der geringen klinischen Bedeutung in dieser Richtung nicht weiter vorangetrieben. Erst die Bedeutung eines Großteils der leukozytären Antigene für die Organtransplantation und die Einführung von serologischen Nachweismethoden mit hoher Reproduzierbarkeit führten dazu, daß die Merkmale des HLA-Systems und ihre Beziehungen zueinander in schneller Reihenfolge entdeckt wurden.

1899 Erste Erwähnung der antigenen Eigenschaft menschlicher Leukozyten durch Metchnikoff (60).

1958 Dausset (22) entdeckt das erste gut definierbare leukozytäre Merkmal Mac (jetzt HLA-A2).

1963 van Rood und Mitarbeiter (81) finden die durch multispezifische Seren definierten Antigene 4a und 4b.

1964 Payne et al. (77) beschreiben eine Gruppe von Merkmalen LA 1 (HLA-A1) und LA 2 (HLA-A2), die durch allele Gene definiert werden.

1966 Bodmer (12) kann dieser Gruppe noch ein drittes Allel hinzufügen, LA 3 (HLA-A3).

1965 gelang es Dausset (23) zu zeigen, daß ein Großteil der bis dahin gefundenen Antigene einem komplexen System angehören, das Hu - 1 genannt wurde und dem heutigen HLA-System entspricht.
Die von Amos (7) stammende Bezeichnung HLA - Human Leukozyte Antigen rührt daher, daß diese Antigene, auch Histokompatibilitätsantigene bzw. Transplantationsantigene genannt, zwar fast in jedem Gewebe vorkommen, in besonders großer Dichte aber auf Leukozyten zu finden sind.

1.2. Genetik.

1.2.1. Entwicklung genetischer Vorstellungen.

Ceppelini und Mitarbeitern (17) gelang es 1967 durch Populations- und Familienuntersuchungen, die Beziehungen der zwei allelen Reihen zueinander aufzudecken. Sie stellten fest, daß die Merkmale des HLA-Systems in mindestens zwei segregante Gruppen gegliedert sind. Die Gene innerhalb jeder Gruppe sind Allele und es tritt jeweils eine gekoppelte Vererbung eines Gens der LA-Gruppe mit einem der Four-Gruppe ein. (Die Bezeichnung der Gruppen stammt aus der Zugehörigkeit der Merkmale LA 1 und LA 2 zur LA-Gruppe und der in den komplexen Antigenen 4a und 4b enthaltenen Merkmalen zur Four-Gruppe). Umstritten war zu diesem Zeitpunkt noch die Frage, ob das HLA-System

von einem oder zwei Loci gesteuert wird (vgl. 55).

Ausschlaggebend für die Richtigkeit der "Zwei-Locus-Theorie" war schließlich:

(1) Der Nachweis von Rekombinationen
(2) Die Möglichkeit der chemischen Trennung der Antigene des Four-Locus von denen des LA-Locus (49, 50).
(3) Das bisherige Fehlen kreuzreagierender Antikörper gegen Antigene beider Loci.

1.2.2. Aktuelles genetisches Konzept.

1.2.2.1. Formalgenetik.

Durch Familienuntersuchungen konnte eine Kopplung des HLA-Genkomplexes mit dem PGM 3 aufgedeckt werden, dem dritten Locus der Phosphoglukomutase (48), der über eine Region des Chromosoms C6 gesteuert wird. Die Entfernung beträgt 15 Centi-Morgan und entspricht einer Rekombination von 15 %. Auf diese Weise war es möglich, nachzuweisen, daß das menschliche HLA-System auf dem autosomalen Chromosom C6 lokalisiert ist. Die Chromosomenregion umfaßt ca. 1/1000 des menschlichen Genoms, annähernd zwei crossover-units und schließt damit mehrere tausend Gene ein. Innerhalb des HLA-Genkomplexes sind heute mehrere Loci bekannt und differenzierbar, die Existenz weiterer Loci wird diskutiert (45). Die Loci der klassischen HLA-Merkmale, deren Genprodukte vor allem mit Hilfe von spezifischen Antiseren nachgewiesen werden, faßt man heute als SD-Loci zusammen, welche die serologisch definierbaren Antigene codieren. Es sind dies die drei eng gekoppelten Loci A, B und C, wobei C auf dem Chromosom zwischen A und B liegt. Sie weisen multiple Allelie auf, vom Locus A sind 14 Allele (Bezeichnung HLA-A)bekannt, vom Locus B 19 Allele (Bezeichnung HLA-B) und vom Locus C 5 Allele (Bezeichnung HLA-C).
Außer diesen schon bekannten Allelen gibt es für jeden Locus

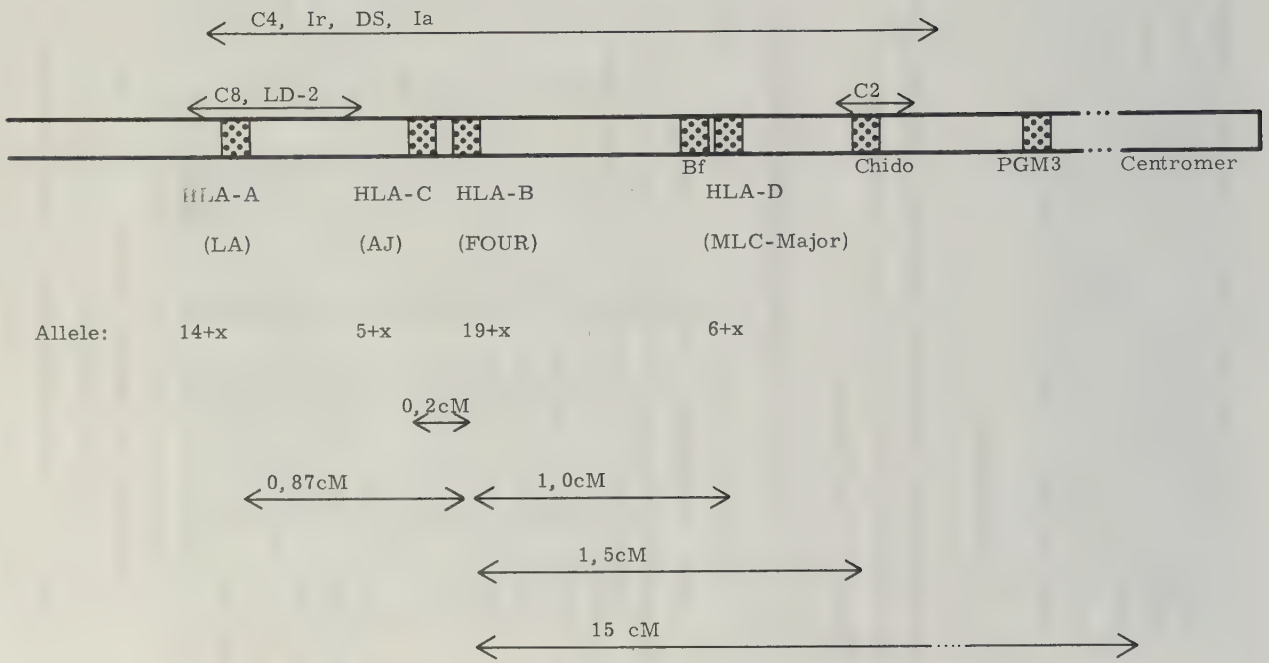
bisher noch nicht serologisch nachweisbare Allele, sog. "X"-Allele, und zwar sind vom Locus A und B je ca. 1 % der Allele noch unbekannt, vom Locus C dagegen noch ca. 50 %.

Von der serologisch definierbaren Gruppe der Antigene grenzt man heute eine durch die Funktion der Lymphozyten definierbare Gruppe ab, die sog. LD-Antigene. Sie werden durch die Transformation der Lymphozyten in der MLC (Mixed lymphocyte culture) bestimmt, wobei die Gesamtheit der LD-Differenz zwischen zwei Personen erfaßt wird. Man unterscheidet den D-Locus (MLC-Major), auch er mit multiplen Allelen, von denen 50 %, nämlich 6 Allele, definierbar sind, und den als LD-2 bezeichneten Genort (MLC-Minor), dessen Existenz im Bereich des Locus A noch nicht gesichert ist.
Die Bezeichnung LD bzw. SD wurde nur zum besseren Verständnis der Zusammengehörigkeit einzelner Antigene eingeführt und bedeutet nicht, daß LD-Antigene nicht auch mit Hilfe der Serologie nachweisbar sind (59), wenn auch nur schwer, oder SD-Antigene über zelluläre Aktivitäten.

In der Chromosomenregion des HLA-Genkomplexes liegen neben den erwähnten Loci noch weitere, die folgende Genprodukte steuern, wobei es für die Lokalisation jedes dieser Genorte bisher nur Hinweise gibt (57):

a) Serumproteine (C2, C4, C8, Bf-System = 3 Properidin-Faktor B u. C3-Proaktivator. Der Komplementfaktor C2 und das Bf-System sollen in der Nähe des D-Locus lokalisiert sein, C8 zwischen Locus A und B.
b) Erythrozytäre Antigene (Chido, Rogers), die zwischen Locus D und PGM 3 vermutet werden.
c) Ir-Antigene (Immun response), die die spezifische Immunantwort gegen Fremdantigene kontrollieren. Ihre Lokalisation scheint sich über eine größere Region in der Nähe des D-Locus zu erstrecken.
d) Ia-Antigene. Die I-Region, welche Ir- und SD-Loci ein-

Abbildung 1 : Chromosom 6 mit HLA-Genkomplex (57)



schließt, codiert auch serologisch nachweisbare Antigene.

e) DS-Loci (Disease Susceptibility). Sie sind für die Empfänglichkeit des Organismus für eine bestimmte Erkrankung verantwortlich. Durch das Vorliegen von Kopplungsungleichgewichten könnte das gehäufte Auftreten bestimmter HLA-Merkmale bei gewissen Erkrankungen erklärt werden (5).

1.2.2.2. Nomenklatur.

Nach Beschluß des Terminology Committee im Rahmen des 6th Histcompatibility Workshop 1975 ist die Nomenklatur des HLA-Systems wie folgt festgelegt (103).

Tabelle 1: Nomenklatur der Genprodukte des A- und B-Locus.

A-Locus				B-Locus			
neu	bisher	neu	bisher	neu	bisher	neu	bisher
HLA-A 1	HL-A 1	HLA-Aw24	W24	HLA-B 5	HL-A 5	HLA-Bw17	W17
HLA-A 2	HL-A 2	HLA-Aw25	W25	HLA-B 7	HL-A 7	HLA-Bw21	W21
HLA-A 3	HL-A 3	HLA-Aw26	W26	HLA-B 8	HL-A 8	HLA-Bw22	W22
HLA-A 9	HL-A 9	HLA-Aw30	W30	HLA-B12	HL-A12	HLA-Bw35	W 5
HLA-A10	HL-A10	HLA-Aw31	W31	HLA-B13	HL-A13	HLA-Bw37	Ty
HLA-A11	HL-A11	HLA-Aw32	W32	HLA-B14	W14	HLA-Bw38	W16.1
HLA-A28	W28	HLA-Aw33	W19.6	HLA-B18	W18	HLA-Bw39	W16.2
HLA-A29	W29	HLA-Aw34	Malay	HLA-B27	W27	HLA-Bw40	W10
HLA-Aw19	Li c	HLA-Aw36	Mo	HLA-Bw15	W15	HLA-Bw41	Sabe11
HLA-Aw23	W23	HLA-Aw43	BK	HLA-Bw16	W16	HLA-Bw42	MWA

Die genetische Region wird mit "HLA" bezeichnet, dabei wurde der bisherige Bindestrich zwischen HL und A gestrichen. Die Genloci, die diesem System angehören, werden mit einem oder mehreren Buchstaben, die der Bezeichnung HLA folgen, identifiziert. Die jeweiligen Allelen eines Locus und die korrespondierenden Spezifitäten werden durch eine Zahl nach dem Genlocus-Symbol gekennzeichnet. Wie bisher werden vorläufig identifizierte Spezifitäten mit dem Index "w" versehen, welcher zwischen dem Buchstaben des Locus und der Nummer des Allels steht.

1.2.3. Vererbungsmodus.

Die Genprodukte der Loci des HLA-Systems, die über eine Region des Chromosoms C6 gesteuert werden, weisen einen kodominanten Erbgang auf (kodominant: die phänotypische Wirkung aller Gene ist nebeneinander nachweisbar). Durch die Meiose kommt es zur Trennung der homologen Chromosomenpaare, so daß jede Keimzelle mit einem haploiden Chromosomensatz und der halben DNS-Menge einer normalen Somazelle versehen wird. Dieser Trennung unterliegt auch das autosomale Chromosomenpaar C6, dabei stellt jedes seiner beiden Chromosomen mit der Information für alle eng gekoppelten Genloci einen Haplotyp dar. Bezogen auf das HLA-System im engeren Sinne kann man einen Haplotyp als die Kombination je eines Gens des A, B und C Locus bezeichnen, die gewöhnlich gekoppelt vererbt wird (55). (Ausnahme: Rekombination). Jede Keimzelle erhält nur einen Haplotyp. Ein Individuum kann von jedem Locus maximal zwei verschiedene HLA-Antigene besitzen, die niemals gemeinsam vererbt werden. Somit hat jeder Mensch nur zwei verschiedene Haplotypen. Da je ein Haplotyp des Vaters und einer der Mutter auf ein Kind vererbt wird und dessen Genotyp ergibt, können Kinder derselben Eltern nur 4 verschiedene Haplotyp-Kombinationen aufweisen. In 25 % der Fälle ist

damit zu rechnen, daß Geschwister HLA-identisch sind (85), d.h. den gleichen Genotyp aufweisen, was besonders für Organtransplantationen wichtig zu wissen ist. Mit 100%-iger Sicherheit findet man eine HLA-Kompatibilität nur bei eineiigen Zwillingen.

Beispiel 1 (52):

Vater: A11-Bw35 / Aw19-B13 Mutter: A2-B12 / A9-Bw21

a b c d

a und b sind die Haplotypen des Vaters, c und d die der Mutter. Bei den Kindern traten folgende Genotypen bzw. Haplotypkombinationen auf:

	Genotypen	Haplotypen
Kind 1	A11-Bw35 / A2-B12	a / c
Kind 2	Aw19-B13 / A2-B12	b / c
Kind 3	Aw19-B13 / A9-Bw21	b / d
Kind 4	Aw19-B13 / A9-Bw21	b / d

Kind 3 und 4 sind HLA-identisch.

Bisher sind, wie schon erwähnt, vom A-Locus 14, vom B-Locus 19 und vom C-Locus 5 phänotypisch unterschiedliche Antigene bekannt. Von dieser Chromosomenregion werden also mindestens 38 Antigene codiert.
Dieser extreme Polymorphismus des menschlichen HLA-Systems wird besonders eindrucksvoll, stellt man folgende Überlegungen an: Unter der Annahme von 40 Genen auf den 3 Loci eines homologen Chromosoms können über 300 000 verschiedene Genotypkombinationen entstehen, für die Kombination des A- und B-Locus allein existieren bereits fast 20 ooo Möglichkeiten. Diese Werte lassen sich nach folgender Formel

berechnen (aus 38 in modifizierter Form).:

$$\frac{n(n+1}{2} \times \frac{m(m+1)}{2} \times \frac{p(p+1)}{2}$$

n, m und p bedeuten die Anzahl der Spezifitäten der Loci A, B und C.

Der Polymorphismus des Histokompatibilitätssystems wird heute als einer der wahrscheinlich wesentlichen Voraussetzungen für die Entstehung und Aufrechterhaltung der physischen Identität eines multizellulären Organismus angesehen (zit. aus 47), zeigt aber gleichzeitig, wie gering die Chancen sind, bei einem nicht verwandten Spender Kompatibilität vorzufinden. Dies wiederum führt zur Anwendung des HLA-Systems bei strittigen Abstammungsfragen (89).

Die relative Häufigkeit der einzelnen HLA-Merkmale ist recht unterschiedlich in einer Population. Interessant ist, daß die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Merkmale je nach geographischem Raum Unterschiede aufweisen kann (56 - 57).

1.2.4. Charakteristische Besonderheiten der Vererbung.

1.2.4.1. Kopplungsungleichgewicht.

Einige HLA-Genkombinationen treten in einer Population häufiger auf, als dies der Fall wäre, wenn man eine völlig zufallsabhängige Vererbung von zwei bzw. drei Serien zugrundelegt. Es besteht also ein Ungleichgewicht in der Kopplung der Gene, wobei sich der Beobachtungswert von dem aufgrund der Genfrequenz berechneten Wert unterscheidet (5). Ein derartiges Kopplungsungleichgewicht konnte Mayr (57) zwischen folgenden Merkmalen finden (aufgeführt sind die höchsten positiven Assoziationen).

HLA-A / HLA-B: A1, B8; Aw25, B18; Aw33, B14; Aw23, B12; Aw30, B13; A11, Bw35; A3, B7.

HLA-A / HLA-C : Aw23, Cw4.

HLA-A / HLA-C : Bw35, Cw4; Bw15, Cw3; B27, Cw2; B12, Cw5; Bw40, Cw2; Bw40, Cw3; Bw22, Cw1; B27, Cw1; Bw22, Cw3; B5, Cw1.

Das Phänomen des Kopplungsungleichgewichtes ist auch aus anderen Blutgruppensystemen, wie z. B. Rh-System und MNS-System bekannt.

1.2.4.2. Rekombination.

Durch die Meiose wird nicht nur die Halbierung des Chromosomensatzes und der DNS-Menge erreicht, die Glieder der homologen Chromosomenpaare haben dazuhin die Möglichkeit, genetisches Material in Form eines Crossing-over auszutauschen. Dabei kann es vorkommen, daß der Haplotyp nicht als solcher vererbt wird, sondern es bei einem der Eltern zu einem Austausch der Gene des A-, B- oder C-Locus kommt. Es entsteht dann ein Haplotyp, der teils aus Genen des einen, teils aus Genen des anderen Chromosoms besteht.

Beispiel 2 (85) :

Vater: A1-B5 / A2-B7 ; Mutter: A3-B8 / A9-B12
a b c d

a und b sind die Haplotypen des Vaters, c und d die der Mutter. Bei ihren Kindern traten folgende Genotypen auf, wobei Kind 5 eine Rekombination aufweist.

	Genotypen	Haplotypen
Kind 1	A1-B5 / A3-B8	a / c
Kind 2	A1-B5 / A9-B12	a / d
Kind 3	A2-B7 / A3-B8	b / c
Kind 4	A2-B7 / A9-B12	a / d
Kind 5	A1-B7 / A9-B12	a:b / d

Rekombinationen fand man bisher zwischen verschiedenen Loci, nicht aber innerhalb eines Locus. Dies wird als Hinweis dafür gewertet, daß der Abstand zwischen den Loci größer ist als der Raum, den eine Serie selber einnimmt (13). Die Häufigkeit der Rekombinationen, die bei Frauen häufiger auftreten als bei Männern (85), schwanken je nach Autoren zwischen 0,5 % und 2 % (z.B.: 13, 46, 88) .

1.2.4.3. Homo- und Heterozygotie, Gene dose effect.

Die Tatsache, daß der Genotyp des Menschen durch einen Haplotyp des Vaters und einen der Mutter bestimmt wird, bringt es mit sich, daß je nach dem Genotyp der Eltern das Kind auf jedem der Loci gleiche oder verschiedene Antigene aufweisen kann. Ein Mensch ist homozygot bezüglich eines Locus, wenn er zwei gleiche Antigene der jeweiligen Serie besitzt, er ist heterozygot, wenn dieser Locus durch zwei verschiedene Antigene vertreten ist.

Beispiel 3: Genotyp des Vaters : A1-B8 / A9-Bw35
Genotyp der Mutter : A2-B14/A1-B5
Genotyp des Kindes : A1-B8 / A1-B5

Das Kind ist homozygot bezüglich Locus A und heterozygot bezüglich Locus B.

Die Zygotie eines HLA-Merkmals läßt sich durch eine HLA-Typisierung der Familie über mindestens 2 Generationen oder durch quantitative Komplement-Fixations-Teste an Thrombozyten feststellen.
Ist für einen Locus nur ein Merkmal bestimmbar, so spricht dies im Falle des A-Locus mit großer Wahrscheinlichkeit für Homozygotie (Ausnahme A 10), im Falle des B-Locus aber für Heterozygotie (55). Die Zygotie hat vor allem Bedeutung für das Auffinden neuer Spezifitäten.

Gene dose effect: Bei der Reaktion von monospezifischen Seren mit Zellen, die bezüglich des entsprechenden Antigens homo- bzw. heterozygot sind, stellt man häufig fest, daß Zellen, heterozygot bezüglich des Antigens, schwächer reagieren als Zellen, die homozygot bezüglich des Antigens sind. Die Reaktionsweise kann jedoch nur als Hinweis gelten, nicht als Beweis der Zygotie. Unterschiedliche Zygotie bzw. der gene dose effect erklären auch manche falsch positive Reaktion. Dabei enthält das Antiserum sehr schwache Antikörper, die nur mit Zellen reagieren, die das entsprechende Antigen homozygot tragen (4).

1.3. Antigene.

1.3.1. Leukozytäre Antigene.

Ein Charakteristikum der HLA-Merkmale ist, daß sie in besonders großer Dichte auf Leukozyten vorkommen. Die folgende Zusammenstellung gibt einen Überblick über Antigene, die nur auf Leukozyten vorkommen und Antigene, die zusätzlich auch im Gewebe nachweisbar sind, außerdem über ihren eventuellen Einfluß auf die HLA-Merkmale, deren Vererbung und Nachweis (55).

a) Antigene, die an Leukozyten und im Gewebe nachweisbar sind: 1.) ABO-Blutgruppen, die mit ziemlicher Sicherheit an allen Zellen des Körpers auftreten.
2.) HLA-System (siehe 1.3.2.).
3.) System 5a - 5b. Diese zwei Merkmale werden über zwei kodominante Allele gesteuert und unabhängig vom HLA-System vererbt. Sie haben für die Organtransplantation keine Bedeutung.

b) Antigene, die nur an Leukozyten nachweisbar sind.

1.) Granulozytenspezifische Merkmale:

a) Merkmal 9a mit dominantem Erbgang, vom HLA-System unabhängig.

b) Merkmal NA1, NB1 und Vaz. Sie kommen nur an neutrophilen Granulozyten vor und sind genetisch voneinander und vom HLA-System unabhängig.

2.) Lymphozytenspezifische Merkmale:
LgD1 ist bisher das einzige Merkmal, das ausschließlich an Leukozyten nachweisbar ist.

1.3.2. HLA-Antigene als spezielle leukozytäre Antigene.

1.3.2.1. Lokalisation und chemischer Aufbau.

Die HLA-Merkmale stellen speziesspezifische Oberflächenstrukturen (Isoantigene) dar, Proteinmoleküle, die auf den Membranen aller kernhaltigen Zellen, einschließlich Leukozyten und Thrombozyten, dermaler und epidermaler Zellen vorkommen. Sporadisch sind sie auch sogar auf Erythrozyten nachweisbar (67). Sie sind unlöslich an die Zelloberfläche gebunden und in ungleichmäßig verteilten Arealen angeordnet. Das Vorkommen der HLA-Determinanten auf allen kernhaltigen Zellen mit Proteinsynthese hat zur Folge, daß sie kontinuierlich neu gebildet und im Serum ausgeschieden werden (79). So findet man die Gewebsantigene auch in gelöster Form im Serum (41) und zwar im wesentlichen als Bestandteil oder Begleitkomponente der β - Lipoproteine. Es handelt sich dabei um abgestoßene Membranbestandteile (55).

Auf Tumorzellen findet man stets entweder die Antigenzusammensetzung der Normalzelle oder einen Antigenverlust, niemals jedoch das Auftreten zusätzlicher Spezifitäten.

Kuwert (47) schloß daraus, daß nur Zellen mit denselben HLA-Antigenen oder einem Antigenenverlust der allogenetischen Kontrolle in Form einer Immuneliminierung entgehen können. HLA-Antigene lassen sich im Gewebe von Foeten schon frühzeitig im Verlauf der Schwangerschaft nachweisen, laut Kuwert ab der 21. Schwangerschaftswoche. Sie entstehen wahrscheinlich früher, wie provozierte Antikörper im mütterlichen Blut vermuten lassen (siehe 1.6.1.4.2.) (75).

Die Konzentration der HLA-Antigene auf den verschiedenen Organen nimmt in folgender Reihenfolge der Quantität nach ab (47):

Milz>Leber>Lunge>Niere>Herz>Darm>Aorta

HLA-Antigene kommen auf allen Geweben und Zellen vor, mit Ausnahme des Fettgewebes.

Die chemische Struktur der HLA-Antigene ist bisher noch nicht restlos aufgeklärt. Erste Untersuchungen ließen vermuten, daß es sich um Lipoproteine oder Glykoproteine handelt mit 92 % Proteinen und 8 % Neutralzucker, die ein Molekulargewicht von 50 000 - 60 000 aufweisen (47). Engelfriet (29) charakterisiert sie als Mucoproteine mit Polysaccharid- und Polypeptidanteil. Nach einer Darstellung von Tanigaki und Pressmann (93) bestehen die SD-Antigene aus Glykoproteinen: Eine schwere Kette, welche HLA-Antigen-Aktivität trägt, und eine leichtere Kette, die dem β_2-Mikroglobulin entspricht, sind dabei nicht kovalent gebunden. Ungeklärt ist noch, ob die Kohlenhydrate für die Antigenität eine Bedeutung haben oder nicht, wahrscheinlich haben sie jedoch keine Haptenfunktion (79).

1.3.2.2. Antigenität - Immunogenität.

Durch die Homo- bzw. Heterozygotie kommt es zu unterschiedlicher Reaktionsstärke, durch die Antigenität zu unterschiedlicher Reaktionshäufigkeit. Nymand (71) und Nielsen (70)

fanden, daß die Antigene des B-Locus insgesamt eine größere Immunogenität als die Antigene des A-Locus aufweisen. Svejgaard (92) und auch Brunner (15) stimmen dem bei, während Spielman und Seidl (90) allen Antigenen hinsichtlich der Immunogenität gleiche Bedeutung beimessen.
Als eine Maßzahl für die Antigenität der einzelnen Antigene wird im allgemeinen der Quotient zwischen der Zahl der tatsächlich gefundenen Antikörper und dem theoretischen Wert aufgrund der Genfrequenz verwendet (55). Je höher der Quotient ist, um so stärker ist die Antigenität des betreffenden Merkmals zu bewerten. Nach Dausset weisen folgende Spezifitäten die höchsten Quotienten (in absteigender Reihenfolge) auf.

Leukoagglutinierende Antikörper : B7; A2; B8.
Cytotoxische Antikörper : A2; B5; B12; B7; A1; A3.

Oh (73) fand durch seine Untersuchungen, daß B5 und B14 eine statistisch signifikant höhere Immunogenität als die andere Antigene haben. Seine Ergebnisse hinsichtlich B5 wurden von Nielsen und Brunner bestätigt.
Minev (62) teilt die Antigene aufgrund des Immunogenitätskoeffizienten in folgende drei Gruppen ein: In der ersten Gruppe mit der größten Immunogenität findet man A2, B7, B5, Bw22, B13, B27, Bw40; in der zweiten Gruppe A1, Aw24, A11, Bw35, B14, B12, und in der dritten Gruppe mit der geringsten Immunogenität A3, Aw25, B8.
Zusammenfassend läßt sich, so unterschiedlich die Ergebnisse auch sind, feststellen, daß B5, A2 und B7 wohl eine besonders starke Immunogenität besitzen.

Auch verschiedene Testzellen unterscheiden sich in ihrer Antigenität zum Teil wesentlich voneinander, wobei einzelne Antigene bevorzugt agglutinierende, andere dagegen cytotoxische Antikörper hervorrufen (11). Der Befund leu-

kozytärer Antigenität ist widersprüchlich, denn auf der einen Seite scheint die Antigenität durch das allgemeine Vorkommen einer Immunisierung von Schwangeren von Bedeutung zu sein, auf der anderen Seite zeigte sich aber, daß ohne Vorliegen einer Schwangerschaft zehn oder mehr Bluttransfusionen notwendig, bevor Antikörper nachweisbar sind (75).

1.4. Antikörper des HLA-Systems.

1.4.1. Charakterisierung.

Während Doan (27) 1926 annahm, die Antikörper gegen Leukozyten entsprechen Iso-Hämagglutininen, da sie ohne bekannte Leukozytenstimulation auftraten, vermutete Dausset (21) 1954 schon richtig, daß es sich um Immun-Antikörper handelt, die durch einen leukozytären Stimulus bei einer Transfusionsreaktion hervorgerufen werden können.
Payne and Rolfs (76) und van Rood (80) entdeckten 1958, daß Leukoagglutinine auch während der Schwangerschaft aufgrund foetaler Stimulation entstehen, und Terasaki und Mc Clelland (94) konnten 1964 zeigen, daß während einer Schwangerschaft auch cytotoxische Antikörper auftreten können.

Als Reaktion auf Antigene des HLA-Systems können Antikörper folgender biologischer Aktivität gebildet werden (10):

1) leukoagglutinierende
2) lymphocytotoxische
3) an Thrombozyten komplementbindende
4) coombsobligate

Hierbei handelt es sich um verschiedene Antikörper und nicht um dieselben, die nur durch unterschiedliche Methoden nachweisbar sind (39). Übereinstimmung herrscht darin, daß es sich um Immunantikörper handelt, die vor allem der

Immunglobulinklasse IgG (Sedimentationskonstante 7 S) angehören, auch schon in der ersten Phase der Antikörperbildung, daß aber auch IgM Antikörper (Sedimentationskonstante 19 S) auftreten können (3, 11, 38, 104). Die IgG Antikörper sind placentagängig und konnten vereinzelt im Nabelschnurblut nachgewiesen werden (vgl. 1.6.1.4.1.). Im Blut von Erst- und Mehrgebärenden kommen komplette Leukozyten-Antikörper wesentlich häufiger vor als inkomplette, genau umgekehrte Verhältnisse liegen bei polytransfundierten Personen vor, wobei die Spezifität von kompletten und inkompletten Antikörpern fast gleich ist (39). Inkomplette Antikörper sind nur schwer nachweisbar und deshalb für Gewebetypisierungen nicht geeignet (104). Cytotoxische Antikörper treten sowohl bei Polytransfundierten, als auch während der ersten Schwangerschaft viel häufiger auf als agglutinierende Antikörper (39, 74). Die Antikörper sind als Iso-Antikörper zu charakterisieren, da sie nie gegen die Leukozyten des Trägers, sondern nur gegen fremde Leukozyten gerichtet sind.

Die Seren mit Leukozyten-Antikörpern lassen sich durch Absorptionsuntersuchungen hinsichtlich der Zellspezifität folgendermaßen differenzieren (10, 30).

a) Seren mit Antikörpern, die nur gegen Lymphozyten gerichtet sind.
b) Seren mit Antikörpern, die nur gegen Granulozyten gerichtet sind.
   a) und b) zeigen keine Reaktion mit Fibroblasten.
c) Seren mit Antikörpern, die sowohl mit Lymphozyten, als auch mit Granulozyten reagieren. Diese Antikörper ergeben auch positive Reaktionen mit Fibroblasten, sind also nicht zellspezifisch.

Für das HLA-System sind nur Antikörper mit Speziesspezifität (HLA-spezifisch) repräsentativ, nicht dagegen solche mit Zellspezifität (z. B. nur gegen Lymphozyten).

Die Differenzierung kann durch Verwendung menschlicher Gewebekulturen erfolgen. Den zellspezifischen Antikörpern kommt keine große Bedeutung zu, da die Mehrheit der cytotoxischen Antikörper schon in der ersten Schwangerschaft, so Overweg (74), sowohl gegen Granulozyten, als auch gegen Lymphozyten gerichtet sind. Derartige gegen gemeinsame Merkmale der Leukozyten gerichtete Antikörper treten auch bei Multiparae und bei Polytransfundierten am häufigsten auf, gefolgt von granulozytenspezifischen Antikörpern. Lymphozytenspezifische Antikörper sind dagegen in den seltensten Fällen vorhanden. Die leukozytären Iso-Antikörper sind nicht substratspezifisch, sie kommen in fast allen Zellen und Geweben des Organismus vor, aber sie sind gruppenspezifisch (vgl. kreuzreagierende Antikörper 1.4.2.) (38).

Die Breite des Antikörperspektrums ist in den Seren polytransfundierter Patienten größer als bei Multiparae, da die Zahl der inkompatiblen Leukozyten-Antikörper mit jeder Transfusion wächst. Bei HLA-Antikörpern, die durch eine Schwangerschaft hervorgerufen werden, hängt das Antikörperspektrum hauptsächlich von der HLA-Differenz zwischen Vater und Mutter ab (10). Mit der Zahl der Schwangerschaften nimmt die Spezifität ab (9, 97).

1.4.2. Kreuzreaktivität.

1968 führten Svejgaard und Kissmeyer Nielsen (92) den Begriff " Kreuzreaktivität " in die Terminologie des HLA-Systems ein. Unter Kreuzreaktivität versteht man die Reaktion eines monospezifischen Antiserums mit verschiedenen Antigenen, wobei auch monospezifische Antisera gegen jedes einzelne dieser Antigene vorliegen. Die Antiseren mit Antikörper gegen jeweils nur eines der verschiedenen Antigene überlappen sich in ihrer Reaktivität aufgrund der Existenz Heterozygoter bezüglich dieser Anti-

gene (29). Man faßt die Merkmale, gegen die oft kreuzreagierende Antikörper gebildet werden, zu sog. " Kreuzreagierenden Gruppen " zusammen. Durch Absorption mit Zellen, die nur ein Antigen einer kreuzreagierenden Gruppe tragen, werden alle Antikörper, die gegen diese Gruppe gerichtet sind, entfernt. Die Existenz kreuzreagierender Antikörper läßt sich auf die große Ähnlichkeit der chemischen Struktur (oder Teile davon) einzelner Antigene zurückführen.

Mittal (63, 64) konnte 1970 aufgrund eigener Untersuchungen das Phänomen der Kreuzreaktivität folgendermaßen charakterisieren:

- Stets werden alle Merkmale, gegen die sich ein kreuzreagierender Antikörper richtet, durch denselben Locus codiert. HLA-Merkmale der einen Serie kreuzreagieren nicht mit solchen der anderen Serie.
- Kreuzreagierende Gruppen sind untereinander verbunden, d. h., ein Merkmal kann in mehreren Gruppen vorkommen.
- Kreuzreaktion kann in beiden Richtungen oder nur in einer bestehen. Absorbiert ein Antigen y einen Antikörper Anti-x, so heißt das noch nicht, daß auch das Antigen x den Antikörper Anti-y absorbiert.
- Kreuzreaktivität zeigt sich nur in manchen Seren einer bestimmten Spezifität, es kann also auch monospezifische Seren derselben Spezifität geben.
- Einige Zellen mit einem bestimmten Antigen kreuzreagieren mit einem bestimmten HLA-Antiserum, andere Zellen mit demselben Antigen aber nicht.

Aufgrund von Absorptionsuntersuchungen teilt man die Seren in zwei Gruppen ein (53).

1) Seren, die nur kreuzreagierende Antikörper enthalten.
2) Seren, die sowohl monospezifische, als auch kreuzreagierende Antikörper gegen dasselbe Antigen enthalten, d. h., bei Absorption mit Zellen, durch die nur die

kreuzreagierenden Antikörper erfaßt werden, bleiben die monospezifischen Antikörper zurück.

Bisher beschriebene kreuzreagierende Gruppen (55):

A-Locus	B-Locus
A1 / A3 / A11	B5 / Bw35 / Bw15 / Bw17 / B18 / Bw21
A1 / A10 / A11	B7 / Bw40 / Bw22 / B27
A1 / A9	B7 / B8
A1 / A2 / A9	B8 / B14
A2 / A28	B12 / B13
A2 / A9	B13 / Bw40
A10 /Aw19	B13 / B27

Kreuzreagierende Antikörper sind für das Auffinden neuer Spezifitäten von Bedeutung. Indem Seren nicht mit allen Trägern eines Merkmals positiv reagieren, kann unter gewissen Umständen der komplexe Aufbau eines HLA-Antigens aufgedeckt werden (83). Andererseits schränken sie den Wert von Absorptionsuntersuchungen für das Kriterium der Monospezifität stark ein (53).
Die Existenz der Kreuzreaktivität hat auch praktische Konsequenzen: Da Sensibilisierungen innerhalb einer kreuzreagierenden Gruppe selten zu erwarten sind, kann man bei Vorliegen einer Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger im HLA-System im Notfall auf einen Spender mit einem HLA-Antigen derselben kreuzreagierenden Gruppe ausweichen. Dieses Vorgehen wird vor allem bei Organtransplantationen angewandt.
Kommt es aber doch zu einer Sensibilisierung innerhalb einer kreuzreagierenden Gruppe, so führt dies, wie Thorsby (96) zeigen konnte, zu Antikörpern mit enger Spezifität.

1.4.3. Gewinnung von Testseren.

Die zur Bestimmung der HLA-Merkmale notwendigen Testseren

werden meist aus Seren von prima- und multiparen Frauen gewonnen oder durch gezielte Immunisierung von Freiwilligen. Entscheidendes Kriterium für die Verwendung als Testserum ist die Spezifität der Antikörper. So werden die Seren, die in Frage kommen, zunächst im mikrolymphocytotoxischen Test gegen ein hochselektiertes Panel von Leukozyten geprüft, die alle Antigene in verschiedenen Kombinationen tragen.

1.5. Nachweismethoden

1.5.1. Nachweismethoden für HLA-Antigene.

Zur Erfassung der HLA-Antigene hat sich von mehreren Methoden heute vor allem die Gewebetypisierung durchgesetzt, die serologische Auswertung erblicher Leukozyten- bzw. Thrombozytenmerkmale durch möglichst monospezifische Testseren. Lymphozyten, Thrombozyten und Granulozyten haben sich als Testzellen besonders bewährt, da sie im Gegensatz zu suspendierten Zellen aus Gewebeproben leichter zu isolieren sind (91).
Mit den einzelnen Methoden, denen alle eine Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde liegt, werden jeweils die Determinanten anderer Zellen nachgewiesen (51):

Leukoagglutination	-	Granulozyten
Komplementbindung	-	Thrombozyten
Lymphozytotoxität	-	Lymphozyten

Aufgrund des großen Mangels an Testseren wurden Mikromethoden entwickelt, die mit äußerst geringen Serummengen arbeiten. Da eine ausführliche Darstellung aller Methoden hier zu weit führen würde, sind nur die wichtigsten im Prinzip erörtert und jeweils die am häufigsten angewandte Testtechnik erwähnt.

a) Mikro-Leukoagglutinationstest.

Kommt es zwischen den Leukozyten des zu typisierenden Blutes und dem zugesetzten Testserum zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion, so zeigt sich dies in einer Agglutination der Leukozyten und zwar ohne Zusatz von Komplement (55, 104). Auf diesem Prinzip beruht zum Beispiel die Methode nach van Rood (78).

b) Mikromethode der Komplementbindungsreaktion der Thrombozyten.

Bestimmte HLA-Antikörper können, wenn sie auf die korrespondierenden Antigen-Determinanten der Thrombozyten treffen, Antigen-Antikörper-Komplexe bilden und Komplement anlagern. Das Vorhandensein oder der Verbrauch von Komplement wird mit Hilfe eines hämolytischen Systems nachgewiesen. Liegt das Antigen auf den Thrombozyten nicht vor, so werden die zugesetzten Hammelerythrozyten hämolysiert (54). Häufig angewandt wird die Methode nach d'Amaro und Svejgaard (20).

c) Mikrolymphozytotoxizitätstest.

Die isolierten Lymphozyten werden mit Testserum und Komplement versetzt. Tritt eine Antigen-Antikörper-Reaktion ein, d.h. befinden sich die komplementären Merkmale der Testseren auf den Lymphozyten, so werden diese durch die Komplementeinwirkung zerstört. Die abgetöteten Lymphozyten lassen sich mit Farbstoff (z.B. Eosin) anfärben und so von den lebenden Zellen leicht unterscheiden.

Folgende Techniken werden hauptsächlich angewandt:

1) Methode nach Kissmeyer-Nielsen und Kjerbye (44).

2) NIH-Standardtechnik nach Terasaki (94).

Beide Möglichkeiten lassen sich für die Gewebetypisierung gut verwenden, wobei die Methode nach Kissmeyer-Nielsen kürzere Inkubationszeiten benötigt, die NIH-Standardtechnik aber wesentlich empfindlicher ist.

1.5.2. Nachweismethoden für Antikörper.

Für den Nachweis der HLA-Antikörper lassen sich im Prinzip dieselben Methoden anwenden, nur ist dabei das Serum bzw. die enthaltenen Antikörper die unbekannte Größe, während die Lymphozyten bzw. die Antigene ihrer Oberfläche schon definiert sind. Bei einem Screening (Antikörpersuchtest) geht man dabei so vor, daß man alle Seren gegen die Leukozyten (Granulozyten oder Lymphozyten) nicht verwandter Spender testet. Die Zellen der Spender sollten möglichst das komplette Antigenmuster des HLA-Systems in verschiedenen Kombinationen umfassen. So sind agglutinierende Antikörper im Leukozyten-Agglutinations-Test nachweisbar, cytotoxische Antikörper im Lymphocytotoxizitätstest und komplementbindende Antikörper in der Komplementbindungsreaktion an Thrombozyten.

1.5.3. Vergleich der Methoden.

Ein Vergleich dieser drei Methoden zeigt, daß die Komplementbindung an Thrombozyten die größte Reproduzierbarkeit und Spezifität aufweist, der Prozentsatz an positiven Ergebnissen aber am geringsten ist (87). Es werden nur relativ spezifische und starke Leukozyten-Antikörper erfaßt. Die Agglutinationsmethode ist weniger spezifisch und weniger verläßlich als die cytotoxische Methode, weist aber am meisten positive Seren auf und erfaßt damit polyspezifische und auch schwache Antikörper. Die cytotoxische Methode nimmt bei all diesen Kriterien eine Mittelstellung ein und hat sich inzwischen fast allgemein als Methode der Wahl durchgesetzt.

1.6. Immunisierung und Konsequenzen.

1.6.1. Möglichkeiten einer Immunisierung.

Antikörper (Immunglobuline) sind Proteinmoleküle (Glykoproteine), die im Rahmen der humoralen Abwehr von spezialisierten Zellen (Plasmazellen) als spezifische Reaktionsprodukte auf antigenen Reiz gebildet werden (zit. aus 36). In diesem Sinne können auch die Genprodukte des HLA-Systems, die HLA-Merkmale, in einem inkompatiblen Organismus die Bildung von spezifischen Antikörpern induzieren, wobei die Kontrolle der Antikörperbildung im Zusammenhang mit den Eigenschaften der T-Lymphozyten steht. Die Ursache der Inkompatibilität liegt in der Tatsache, daß mehrere allele HLA-Antigene existieren, also Antigene, die sich gegenseitig vertreten können. Somit ist es nicht nur möglich, sondern aufgrund des ausgeprägten Polymorphismus sogar wahrscheinlich, daß unterschiedliche HLA-Genkombinationen aufeinandertreffen und als fremd erkannt, humorale Reaktionen hervorrufen.

Als gesichert gilt, daß folgende Ereignisse eine Sensibilisierung im HLA-System auslösen können, mit HLA-Antikörpern in Zusammenhang stehen.

1) Transfusion
2) Transplantation
3) freiwillige Immunisierung
4) Schwangerschaft

1.6.1.1. Transfusion.

Bei einer Bluttransfusion wird heute, außer bei gezielter Indikation, auf das Vorliegen einer Kompatibilität im HLA-System nicht geachtet. Aufgrund der großen Zahl an Genotypkombinationen erhalten die Empfänger somit das Blut nicht HLA-identer Spender. Sie werden damit, analog den

Verhältnissen bei einer Organtransplantation, mit inkompatiblen Zellen konfrontiert und können gegen die entsprechenden fremden Genprodukte sensibilisiert werden.
Durch wiederholte Transfusionen steigt für noch nicht Sensibilisierte die Wahrscheinlichkeit immunisiert zu werden, während bei bereits Sensibilisierten die Spezifität der Antikörper abnimmt, das Antikörperspektrum größer wird. Es handelt sich dabei vor allem umcytotoxische Antikörper, während die agglutinierenden seltener und auch in niedrigerem Titer vorkommen. Sie erscheinen meist erst nach einigen Boosterungen neben den cytotoxischen Antikörpern (74). So kann man bei Polytransfundierten in bis zu 90 % der Fälle cytotoxische Antikörper finden. Hammond (35) konnte für diese Art der Antikörper feststellen, daß die Wahrscheinlichkeit einer Sensibilisierung bei wöchentlichen Transfusionen geringer Mengen Blut größer ist und die Antikörper früher nachweisbar sind als bei größeren Mengen Blut im Abstand von 30 bis 60 Tagen, auch wenn die absolute Menge der letzteren Methode größer ist. Die Spezifität der Antikörper nimmt dabei auch bei Blut desselben Spenders mit der Zahl der Transfusionen ab.
Ideale Verhältnisse liegen nur bei HLA-identen Geschwistern vor. Nur durch Transfusionen zwischen ihnen läßt sich auf die Dauer eine Sensibilisierung vermeiden und eine längere Überlebenszeit der Blutkörperchen erreichen (34).

Bei einer Übertragung von HLA-inkompatiblem Blut auf sensibilisierte Personen muß man mit folgenden Konsequenzen rechnen:

1) Febrile nichthämolytische Transfusionsreaktion. Sie entsteht durch die Reaktion der Antikörper mit im Konservenblut vorhandenen intakten Leukozyten. Die Klinik dieser Transfusionsreaktion entspricht der eines pyrogenen Schocks (8). Ist eine Sensibilisierung im HLA-System bekannt, läßt sich diese Reaktion durch Gabe einer

Erythrozytensuspension vermeiden. Ursache derartiger Zwischenfälle können allerdings auch granulozyten- oder thrombozytenspezifische Antigene sein.

2) Verminderte Lebensdauer der korpuskulären Bestandteile. Besonders deutlich tritt dies bei der Transfusion von Thrombozyten- und Leukozytensuspensionen zutage.

3) Gefährdung des Hämostasepotentials. Aufgrund der antithrombozytären Wirkung der HLA-Antikörper kann es zu disseminierter intravasaler Blutung und zu posttransfusioneller Purpura kommen (8).

1.6.1.2. Organtransplantation.

Wie viele Arbeiten aufzeigen, besteht eine positive Korrelation zwischen der Verträglichkeit des Transplantats und der Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Neben den Blutgruppenmerkmalen A und B kommt hierbei besonders dem HLA-System eine große Bedeutung bei. Unter der Voraussetzung einer Kompatibilität im ABO-System ist die Prognose um so besser, je mehr die Loci des HLA-Systems bei Spender und Empfänger identisch sind. Cepellini (18) konnte 1969 in einer Studie zeigen, daß bei Hauttransplantationen die mittlere Überlebensrate bei HLA-identen Geschwistern am besten ist und über nicht HLA-idente Geschwister zu nicht verwandten Personen hin abnimmt. Bezüglich der Überlebenszeit transplantierter Nieren in Korrelation zu der HLA-Identität liegen unterschiedliche Ergebnisse vor (61).
Da auch unter HLA- und ABO-kompatiblen Verhältnissen Abstoßungsreaktionen auftreten können, nahm man schon früher die Bedeutung weiterer Transplantationssysteme an. Dies konnte durch den D-Locus, der den A, B, C-Loci eng benachbart ist, bestätigt werden. Seine Kompatibilität läßt sich vor allem in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) fest-

stellen: Kultiviert man die Lymphozyten von potentiellen Spendern und Empfängern gemeinsam, so werden die Zellen durch unterschiedliche Isoantigene zur Transformation in blastenähnliche Zellen angeregt. Während man bisher bemüht war, potentielle Organempfänger möglichst nicht zu transfundieren, um eine Sensibilisierung im HLA-System zu verhindern, was im Falle einer Transplantation zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion führt, sprechen neueste Untersuchungen dafür, daß unter Vermeidung einer HLA-Sensibilisierung Patienten mit Bluttransfusionen eine bessere Prognose aufweisen, als solche ohne (6). Dies würde allerdings bedeuten, daß alle potentiellen Organempfänger nur mit HLA-kompatiblem Blut transfundiert werden dürfen, was sich bei größeren Mengen als äußerst problematisch erweist. Wie auch im ABO-System eine Übereinstimmung gewisser Untergruppen vernachlässigt werden kann, hat Dausset (24) für das HLA-System nachgewiesen, daß eine Inkompatibilität zwischen kreuzreagierenden Antigenen weniger negative Folgen für eine Transplantation hat, als eine Inkompatibilität zwischen Antigenen, die nicht ein und derselben kreuzreagierenden Gruppe angehören.

1.6.1.3. Freiwillige Immunisierung.

Die gezielte Immunisierung dient der Gewinnung von Testseren mit großer Spezifität. Sie kann durch Bluttransfusionen von demselben Spender, durch Leukozyteninjektionen oder Hauttransplantationen vorgenommen werden (95). Dabei erhält man besonders durch Hauttransplantationen gute cytotoxische Antiseren, wobei ein minimaler Antigen-Stimulus die besten Seren liefert (101).

1.6.1.4. Schwangerschaft.

Auf die Schwangerschaft als mögliche Ursache einer Sensibilisierung im HLA-System wollen wir ausführlicher ein-

gehen, da sie in direktem Zusammenhang mit dem Thema dieser Arbeit steht.

1.6.1.4.1. Ursachen und Ablauf der Immunisierung.

Während der Schwangerschaft gilt der Foet als Allotransplantat, gegen das entsprechende mütterliche Abwehrreaktionen auftreten können. Kindliche Leukozyten bzw. Trophoblastzellen tragen der HLA-Genetik zufolge einen vom Vater ererbten Haplotyp, der sich aufgrund der phänotypischen Vielfalt mit großer Wahrscheinlichkeit von der HLA-Genkombination der Mutter unterscheidet. Die Immunisierung tritt nicht bei jeder Inkompatibilität auf, sondern ist abhängig von der Immunitätslage des Menschen und dem jeweiligen Antigen (32).

Die Immunisierung kann über zwei Mechanismen erklärt werden.

1) Diapedese der Placentarschranke durch foetale Leukozyten. Dies kann aus elektronenoptischen Befunden von Marchesi sowie von Roig de Vargas Linares und Burgos gefolgert werden (zit. aus 9).
2) Durch eine Desquamation, die während der Schwangerschaft kontinuierlich andauert, werden Trophoblastzellen, die in ihrer Antigenzusammensetzung kindlichen Leukozyten gleichen, passiv in den mütterlichen Kreislauf geschwemmt.

Der Nachweis des transplacentaren Übertritts von Zellen von der Frucht auf die Mutter gelang Desai und Mitarbeitern (26) 1966 durch Bluttransfusion mit fluoreszenzmarkierten Leukozyten in die Bauchhöhle des Foeten und späterem Nachweis dieser markierten Blutkörperchen im Kreislauf der Mutter. Der umgekehrte maternofoetale Zellübertritt ist seit 1963 bekannt (25). Der Übertritt HLA-positiver Zellen erfolgt schon intra gravidatem und nicht erst post gravidatem, wie vor allem bei der Rh-Sensibilisierung. Somit kann es schon während der Schwangerschaft zur

Ausbildung leukozytärer Iso-Antikörper im HLA-System kommen (8).
Sind die Leukozyten einmal in die Zelle eingedrungen, haben sie einen Überlebensvorteil, da keine natürlichen Antikörper gegen sie existieren, wie es im ABO-System der Fall ist. Durch die Stimulierung des mütterlichen Immunsystems kommt es zur Bildung von Immunantikörpern.
Die Placenta dient dem Foeten nun als quasi spezifisches Abwehrsystem. Die speziell gegen die Leukozyten des Foeten gebildeten HLA-Antikörper können, obwohl IgG Antikörper und damit placentagängig, in der Regel nicht in den foetalen Kreislauf übertreten (28). Sie werden vom Placentagewebe gebunden und lassen sich dort gut nachweisen, selten jedoch nur im Nabelschnurblut (68). Tongio (99) fand Antikörper nur dann im Nabelschnurblut, wenn eine andere Schwangerschaft oder eine Bluttransfusion vorausgegangen war. Dabei können zur gleichen Zeit Antikörper, gegen die weder die Mutter noch das Kind die entsprechenden Antigene besitzen, diese "Placentabarriere" ungehindert passieren. Dieses Phänomen war der Beweis dafür, daß den Vorgängen an der Placenta eine Absorption zugrunde liegt.
Nach Doughty (28) ist das Absorptionspotential der Placenta offensichtlich sehr groß und es kommt in nur wenigen Fällen, verglichen mit der Häufigkeit von HLA-Antikörpern, vor, daß die Antikörper-Aktivität größer ist, als die vorhandene Antigen-Bindungskapazität. Dann allerdings kann es zum Entstehen einer neonatalen Thrombozytopenie kommen, wie u.a. von Shulman beschrieben (87).

1.6.1.4.2. Zeitpunkt der Immunisierung.

Die Immunisierung kann schon während der ersten Schwangerschaft, und hierbei in den ersten Monaten, erfolgen. Die Antikörper sind dann entsprechend frühzeitig nachweisbar. Von dem Zeitpunkt der Erstimmunisierung an wird die Sensibilisierung intensiv und kontinuierlich aufrechterhalten,

sodaß das Geburtsereignis im Gegensatz zum Rh-System keinen Boostereffekt darstellt. Es sind jedoch auch Beispiele bekannt, in denen Antikörper erst nach der Geburt nachweisbar waren (71). Der Titerverlauf erreicht ungefähr in der 32. Schwangerschaftswoche seinen höchsten Wert (28).

Die Voraussetzung für eine Immunisierung ist, daß der Foet schon Zellen gebildet hat, die die Antigenstrukturen tragen und übertrittsfähig sind. Nach Wintrobe (zit. aus 74) werden Granulozyten im Embryo um die 15. und Lymphozyten um die 18. - 19. Schwangerschaftswoche gebildet.
Über die Art der Zellen und den Zeitpunkt des Übertritts in den mütterlichen Kreislauf geben Untersuchungen von Walknowska (102) Auskunft. Schon im vierten Schwangerschaftsmonat läßt sich durch zytogenetische Charakterisierung von Lymphozyten (44 Autosomen sowie x und y) im Kreislauf der Mutter bei männlichen Foeten der Übertritt HLA-positiver Zellen nachweisen.
Als frühesten Termin für die Sensibilisierung werden die 10. (16), 11. (15), 14. (102), 15. (74) und 16. (28) Schwangerschaftswoche angegeben. Da eine Immunisierung somit auch vor der Entstehung der Leukozyten auftreten kann, müssen auch Embryonalzellen, wohl vor allem Placentazellen, eine Sensibilisierungspotenz besitzen.

1.6.1.4.3. Häufigkeit von HLA-Antikörpern zum Zeitpunkt der Geburt.

Eine Sensibilisierung Schwangerer durch leukozytäre Antigene tritt in durchschnittlich 20 - 40% der Fälle auf, im Gegensatz zur Rh-Sensibilisierung mit einer Häufigkeit von 0,5 - 1%, was auf die größere phänotypische Vielfalt des HLA-Systems zurückzuführen ist. Die Häufigkeit dieser Iso-Antikörper zum Zeitpunkt der Geburt nimmt dabei mit der Anzahl der Schwangerschaften zu, bei Erstgebärenden

beträgt sie 10 - 20%, bei Frauen mit mehr als drei Geburten um 40% (8).
Bertrams (11) hat 440 Schwangere untersucht und bei insgesamt 23,9% (16% agglutinierende, 14% cytotoxische Antikörper, Rest beide Antikörper) zum Zeitpunkt der Geburt Antikörper gefunden, bei Erstpara in 18,4%, bei Zweitpara in 25,2%, bei Drittpara in 25,5% und bei Multipara in 35,7%. Während er cytotoxische und agglutinierende Antikörper ungefähr gleich häufig vorfand, weisen von den nur 14% antikörperhaltigen Seren von 2008 untersuchten bei Nymand (71) 81% cytotoxische Antikörper auf, 3,5% agglutinierende und der Rest beide Spezifitäten.

Diese zwei Beispiele mögen verdeutlichen, wie unterschiedlich die Ergebnisse der einzelnen Autoren über die Häufigkeit der verschiedenen Antikörper sind.
Für Seren mit Leukoagglutinine schwanken die Angaben von 2,5% bei 134 Zweit- und Drittpara und 5,5% bei 148 Frauen mit mehr als drei Geburten (82), über 15% bzw 18% bei 65 Zweit- bzw. 48 Multiparae (32) bis zu maximal 24% bei 296 Zweitpara und 33% bei 368 Multiparae (105). Für Erstpara schwanken die Angaben zwischen 0,6% und 15,4%.
Cytotoxische Antikörper fand B. Brunner (15) in 7,7% von 2800 Seren, wobei ihre Ergebnisse durch einen hohen Prozentsatz an Erstgebärenden geprägt sind, die nur in 1,5% einen Antikörper aufwiesen. Bertrams (10) fand derartige Antikörper in 14,1% von 440 Seren (11,2% der Erstpara) Goodsman und Masaitis (33) dagegen in 46% bei 1553 Schwangeren (27% der Erstpara). Bei diesem Vergleich muß berücksichtigt werden, daß die Häufigkeit des Auftretens von Antikörpern auch von der Empfindlichkeit der Nachweismethode abhängig ist und man erfahrungsgemäß um so mehr Antikörper findet, desto größer das angewandte Panel ist (2).

1.6.1.4.4. Persistenz der HLA-Antikörper.

Bertrams (11) fand bei seinen Untersuchungen drei verschiedene Verhaltensweisen leukozytärer Antikörper nach der Geburt:

1) Agglutinierende und cytotoxische Antikörper persistieren mit gleicher Spezifität für mindestens 12 Monate.
2) Beide Antikörperaktivitäten gehen innerhalb von Monaten zurück (75).
3) Beide Antikörperaktivitäten verhalten sich diametral. Bei der Geburt vorhandene agglutinierende Antikörper können Monate danach nicht mehr nachweisbar sein, dafür aber cytotoxische Antikörper, die unmittelbar post partum fehlten.

Nach seinen Berechnungen kann mit einer Persistenz leukozytärer Antikörper nach der Geburt bei 20 - 30% der Frauen gerechnet werden.

a) Agglutinierende Antikörper: Um genauere Vorstellungen über die Relation der Persistenz zur Zeit zu gewinnen, hat Payne (75) 1962 31 Frauen über 3 Jahre nach der letzten Geburt auf agglutinierende Antikörper untersucht. Sie fand folgendes:

Zeit nach der Geburt	Vollständiger Verlust	Teilverlust
1 Jahr	22%	29%
2 Jahre	40%	45%
3 Jahre	45%	52%

Nach drei Jahren weisen alle Seren mit persistierenden Antikörpern einen Teilverlust der Spezifität auf. In diesem Zeitraum tritt eine Spezifitätsänderung in Richtung Oligo- und Monospezifität auf (9). Diese Ergebnisse konnten zum Teil von Cohen (19) bestätigt werden. Über die längste Zeit des Verbleibens von Leukoagglutininen im Serum nach der letzten Geburt liegen fol-

gende Angaben vor: 7 - 25 Jahre (maximal 39 Jahre) (75); bis zu 31 Jahren (19); bis zu 20 Jahren (55).

b) Cytotoxische Antikörper: Nymand (71) erwähnt die Persistenz cytotoxischer Antikörper bei 8 von 258 Erstpara über 6 Monate nach der Geburt, wobei die Spezifität enger wird. In 3 Fällen traten die Antikörper erst post partum auf. Bertrams und Kuwert (9) fanden cytotoxische Antikörper im Serum bei der Geburt, die aber schon nach 8 Monaten verschwanden oder eine eingeschränkte Spezifität aufwiesen.
Bei Tongio (98) persistierten derartige Antikörper nach 12 - 252 Wochen noch in 13 von 24 Fällen. Dagegen waren in 8 Fällen die Antikörper schon nach 17 - 52 Wochen verschwunden. Durch ein Fortbestehen der Antikörper von einer Schwangerschaft zur anderen wird die Spezifität weiter bzw. größer.
Der Italiener Savi (84) untersuchte in einer groß angelegten Studie das Vorkommen cytotoxischer Antikörper zu verschiedenen Zeiten nach der letzten Schwangerschaft. Er fand bei Frauen mit 2 Kindern in 28% eine Persistenz über mehr als 2 Jahre, in 7% verschwanden die Antikörper innerhalb dieser Zeit. Frauen mit mehr als 2 Kindern wiesen ebenfalls in 28% eine Persistenz über mehr als 2 Jahre auf und in 11% eine Persistenz über weniger als 2 Jahre. Savi gibt als Höchstwert für die Persistenz 31 Jahre an.

Insgesamt liegen über die Persistenz cytotoxischer Antikörper zur Zeit noch relativ wenig Ergebnisse vor, die meisten zudem an einem geringen Untersuchungsgut. Dies mag vor allem daran liegen, daß Antikörper mit cytotoxischen Auswirkungen erst seit ca. 10 Jahren bekannt und nachweisbar sind.

1.6.1.4.5. Konsequenzen einer Sensibilisierung für die Schwangerschaft.

Die HLA-Immunisierung wird im Zusammenhang mit pathologischen Verlaufsformen von Schwangerschaften diskutiert. In einer retrospektiven Studie an 234 Multiparae konnte Naito (69) eine Korrelation zwischen cytotoxischen Antikörpern und kongenitalen Anomalien aufzeigen. Frauen mit mißgebildeten Kindern wiesen in 20% Antikörper auf, Frauen der Vergleichsgruppe nur in 9,8%. Dagegen konnten Sever und Terasaki (86) keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen cytotoxischer Antikörper und verschiedenen Schwangerschaftsanomalien, wie ZNS-Schäden, Mongolismus und Herzvitien finden. Einen schädigenden Einfluß verneinen auch Ahrons, Jensen und Nymand (1, 39, 72). Widersprüchliche Angaben findet man auch über die Wirkung der Antikörper auf den Verlauf des Morbus haemolytikus neonatorum (vgl. 38) und auf die Abortenrate; letztere wird im Rahmen dieser Arbeit noch ausführlich erörtert. (siehe 4.4.2.).

1.7. Fragestellung.

Die vorliegende Arbeit liefert Beiträge zu folgenden Problemstellungen:

Experimentelle Untersuchungen:

1) Die prozentuale Häufigkeit der Persistenz cytotoxischer HLA-Antikörper über 3 - 4 Jahre nach einer Immunisierung im Rahmen einer Schwangerschaft.

2) Die Titerstärke der persistierenden Antikörper.

Statistische Untersuchungen:

1) Faktoren, die im Zusammenhang mit der Häufigkeit und Spezifität der persistierenden Antikörper stehen. Wir stellten uns folgende Fragen:
   a) Persistieren bestimmte Spezifitäten häufiger als andere?
   b) Wie verändert sich das Antikörperspektrum innerhalb von 4 Jahren?
   c) Welchen Einfluß haben zwischenzeitliche Antigenkontakte?
   d) Welchen Einfluß hat die Zahl der Schwangerschaften auf das Spektrum und die Häufigkeit der persistierenden Antikörper?
   e) Hat das Alter der Mutter einen Einfluß auf die Persistenz?

2) Zusammenhang zwischen dem Auftreten cytotoxischer Antikörper und der Abortenhäufigkeit.

3) Veränderungen des Geschlechtsverhältnisses nach einer HLA-Immunisierung.

In einem gesonderten Kapitel wurden Charakteristika des HLA-Systems im Vergleich zum Rh-System als Beispiel erörtert.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Material.

2.1.1. Untersuchungsgut.

Von Oktober 1971 bis Mai 1972 wurden bei 2800 Schwangerenseren im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge neben den gesetzlichen Untersuchungen zusätzlich von B. Brunner (15) eine Untersuchung auf cytotoxische HLA-Antikörper durchgeführt. Es handelte sich bei dieser Untersuchungsgruppe um einen repräsentativen Querschnitt der in Tübingen und weiterer Umgebung stattgefundenen Schwangerschaften. Von den 2800 Seren wiesen 216 = 7,7% cytotoxische Antikörper auf. In 185 Fällen = 6,5% waren die Antikörper definierbar, in 31 Fällen = 1,2% waren sie multispezifisch.

Im Oktober 1975 wurden die Trägerinnen definierter Antikörper, soweit sie noch erreichbar und bereit waren, um eine Blutprobe von ca. 10 ccm gebeten. Wir erhielten in Zusammenarbeit mit dem jeweiligen Hausarzt 105 Proben Vollblut, die wir nach dem Eintreffen zentrifugiert und das Plasma bis zu den Untersuchungen tiefgekühlt gelagert haben.

2.1.2. Fragebögen.

Dem Schreiben an die Antikörperträgerinnen war ein Fragebogen beigefügt, der uns über folgende Daten Aufschluß geben sollte:

1) Zahl der Kinder
2) Zeitpunkt der Entbindungen und eventueller Aborte in ihrer Reihenfolge.
3) Alter der Mutter
4) Zwischenzeitliche Bluttransfusionen
5) Möglichkeiten einer zwischenzeitlichen Immunisierung.

Die Information aus diesen Fragebögen diente uns als Grundlage für die statistischen Untersuchungen.

2.1.3. Testzellen.

Der Antikörpersuchtest und die Titeruntersuchungen wurden mit Lymphozyten von HLA-typisierten Mitarbeitern des Instituts und Blutspendern durchgeführt. Bei den Testzellen interessierten uns nur die Merkmale des A- bzw. B-Locus, da die Antigene des C-Locus bei der ersten Untersuchung noch keine Relevanz besaßen und deshalb nicht bestimmt wurden.

2.1.4. Reagentien und Material.

2.1.4.1. Für die Isolierung von Lymphozyten.

Waschlösung Hanks-Tris 1+1 :

Hanks solution:

NaCl	8,0 g
KCl	0,4 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,06 g
KH_2PO_4	0,06 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$CaCl_2$	0,14 g
Glucose	1,0 g
Aqua dest.ad	1000 ml

Tris -HCL Puffer pH 7,45

Tris	19,1 g
HCl quantum satis fiat	pH 7,45
Aqua dest. ad	1000 ml

Beide Lösungen steril filtriert

Urografin 16,79% : 100,1 ml Urografin 30%
89,4 ml H_2O

Glasperlen ca. 5 mm zum Defibrinieren des Vollblutes.

2.1.4.2. Für die NIH-Standardmethode.

Formalin für die Histologie, säurefrei, mind. 37% Merck 3999

Eosin gelblich 6% in wässriger Lösung
Paraffin subliquidum DAB 7
Waschlösung Hanks-Tris 1+1
Kaninchenkomplement, bei -80 C gelagert, kurz vor Gebrauch aufgetaut.

Mikrotestplatten: Grenier und Cook M 22023 Art. oder
Falcon Mikro-Test 3034
Hamilton Mikrolitherspritzen Nr. 725; 0,25 Gesamtinhalt
Nr. 705; 0,5 Gesamtinhalt
je ein Hamilton Dosierer
Phasenkontrastmikroskop Zeiss.

2.2. Methode

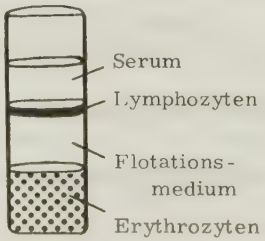
2.2.1. Isolierung der Testzellen aus defibriniertem Blut.

2.2.1.1. Defibrination.

Zu 8-10 ml Nativblut gibt man 5-6 Glasperlen und läßt dies auf dem Defibrinator ca. 15 min. schütteln.

2.2.1.2. Isolierung.

5 ml Urografin werden mit ca. 3-4 ml defibriniertem Blut überschichtet und bei 3000 rpm ca. 20 min. lang zentrifugiert. Das Flotationsmedium ist derart beschaffen, daß sich die Erythrozyten absetzen und die Lymphozyten als trüb-milchiger Ring an der Trennlinie zwischen Serum und Flotationsmedium zurückbleiben.
Die Lymphozyten werden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgezogen und dreimal mit Waschlösung gewaschen und jeweils 5 min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Zellsuspension wird darauf-



hin mit Hilfe eines Mikroskops auf eine Konzentration von ca. 2000 / ml eingestellt.
Die Lymphozyten-Suspension muß innerhalb von 24 std. verwendet werden, da danach ein zu hoher Leerwert an toten Zellen auftritt, um eine Aussage über die Stärke der Reaktion treffen zu können. Aus diesem Grund werden die nicht sofort verwendeten Lymphozyten konserviert.

2.2.2. Konservierung der Testzellen.

Die Konservierung der Lymphozyten-Suspension geschieht durch Einfrieren in flüssigem Sauerstoff unter Zusatz von DMSO (Dimethylsulfoxid) (31). W. Schneider hat in diesem Institut ein Gerät entwickelt, das es gestattet, die Zellen mit einem Temperaturgradienten von 1^{o} C / min. bis 80^{o} C einzufrieren, was einen niedrigen Leerwert nach dem Auftauen garantiert.

2.2.3. Auftauen der Testzellen.

Die Lymphozyten-Suspension, bei - 80^{o} C aufbewahrt, wird in einem Wannenbad bei 37^{o} C möglichst rasch aufgetaut. Nach kurzem Zentrifugieren bei 3000 rpm wird die Suspension zur Entfernung des Zellgiftes DMSO sofort dreimal mit Waschlösung gewaschen. Die Lymphozyten sind dann als Testzellen verwertbar und sollten innerhalb von 12 std. verbraucht sein.

2.2.4. NIH-Standardtechnik des mikrolymphozytotoxischen Tests (nach Terasaki) (14).

Bei der Fragestellung unserer Untersuchung, der Persistenz der Antikörper, kommt es darauf an, mit bekannten Lymphozyten-Merkmalen eventuell vorhandene korrespondierende Antikörperspezifitäten in den Seren nachzuweisen. Die NIH-Standardtechnik (National Institutes of Health) wurde da-

bei quasi unter umgekehrtem Vorzeichen verwendet:
Die Testkammern enthalten in Paraffin eingebettet pro Vertiefung 1 ml Antiserum. Das Öl dient dazu, ein Austrocknen der Kammern zu verhindern.
Wir gehen so vor, daß eine Testkammer die Antiseren von 60 verschiedenen Frauen enthält, die alle mit der gleichen Testlymphozyten-Suspension beschickt werden. Pro Vertiefung wird 1 ml der Suspension zugefügt und das Antigen-Antikörper-Gemisch bei Zimmertemperatur 35 min. lang inkubiert. Durch Zufügen von 5 ml Komplement, das je nach Qualität 70 - 90 min. einwirken muß, werden bei Vorliegen einer Antigen-Antikörper-Reaktion die daran beteiligten Lymphozyten zerstört. Diese Lymphozyten werden durch das Einwirken von 5 ml Eosin für 3 Minuten angefärbt. Zum Schluß wird die Reaktion durch 10 ml Formalin unterbrochen.
Die Lymphozyten brauchen nun ca. 1 - 2 std., um sich abzusetzen, dann können die toten von den lebendigen Zellen leicht differenziert werden.

Bei den in unseren Untersuchungen mit dieser Methode nachgewiesenen Antikörpern handelt es sich um irreguläre, lymphozytotoxische Iso-Antikörper der IgG Klasse der Immunglobuline.

2.2.5. Titeruntersuchungen.

Zur Bestimmung der noch vorhandenen Titerstärke verdünnten wir die antikörper-positiven Seren mit Hanks-Tris-Pufferlösung. Wir untersuchten folgende Verdünnungsstufen:

1 : 1	1 : 4
1 : 2	1 : 6
1 : 3	1 : 8

Wir überprüften diese Verdünnungsreihe mit für jedes Serum extra ausgewählten Lymphozyten, die die Determinanten der aus dem Screening bekannten Spezifität enthielten. Die

Testmethode entspricht der oben erwähnten NIH-Standard-technik.

2.2.6. Dokumentation der Ergebnisse.

Die Ergebnisse wurden nach folgendem Maßstab ausgewertet und dokumentiert, wobei der Anteil an toten Zellen als Scorewert angegeben wird.

Score 1: 0-10 % = negativ
Score 2: 10-20 % = fraglich positiv
Score 4: 20-40 % = schwach positiv
Score 6: 40-70 % = positiv
Score 8: 70 % = stark positiv

Score 3: sehr wenig Zellen, alle lebend
Score 5: sehr wenig Zellen, alle tot.

Die Scorewerte der Reaktionen des jeweiligen Serums mit den Lymphozyten Nr. 1-30 des Panels wurden wie folgt protokolliert.

Abbildung 2:

Lymphozyten Nr.	1 2 3 4 5 6 .... 29 30
Serum Nr.	
1	
2	
3	
4	

Da jeder Lymphozyt bis zu vier verschiedene Merkmale besitzen kann, ist es nicht möglich, aus einer positiven Reaktion auf die Antigendeterminanten bzw. den entsprechenden Antikörper zurückzuschließen. Erst ein Vergleich

der Merkmale aller Leukozyten, die eine positive Reaktion zeigen, gibt einen Aufschluß darüber, welche oder welcher Antikörper im Serum vorliegen bzw. vorliegt. Im Idealfall reagieren alle Testzellen mit einem bestimmten Merkmal, unabhängig von der Kombination der restlichen Merkmale, positiv mit dem betreffenden Serum. Um die bei 30 Testlymphozyten schon recht komplizierten Konstellationen besser überblicken zu können, verwenden wir, wie sich schon bei B. Brunner bewährt hat, Schemata, die von W. Schneider entwickelt wurden und die für das Vorliegen eines bestimmten Antikörpers geforderten positiven Reaktionen übersichtlich darstellen. Ein Vergleich der positiven bzw. negativen Reaktionen bei dem jeweils vorliegenden Serum mit der zu erwartenden Kombination bei den einzelnen Antikörperspezifitäten führt auf diese Weise schnell zu einem Ergebnis. Durch Übereinanderprojektion der geforderten Reaktionskonstellationen verschiedener Antikörperspezifitäten lassen sich auch Seren mit 2 bzw. 3 Antikörperspezifitäten erkennen.

2.2.7. Statistische Berechnungen.

Die in unseren Ergebnissen aufgeführten Signifikanzteste wurden mit folgender Formel berechnet (100):

$$X^2 = \frac{(x_2 - \bar{p} n_2)^2 \times (n_1 + n_2)}{n_1 n_2 \bar{p}\bar{q}}$$

$$\bar{p} = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2} \quad ; \quad \bar{q} = 1 - \bar{p}$$

n_1 = Anzahl sämtlicher Vergleichspersonen (Personen, die die Eigenschaft A und / oder B aufweisen).

n_2 = Anzahl aller Personen mit einer Eigenschaft A ohne Rücksicht auf die Eigenschaft B.

x_1 = Anzahl der Personen mit der Eigenschaft B unter den Vergleichspersonen.

x_2 = Anzahl der Personen mit der Eigenschaft B, die außerdem die Eigenschaft A aufweisen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Qualitativer Antikörpersuchtest.

Bei den 105 Frauen, die nach der NIH-Standardmethode auf das Vorhandensein von cytotoxischen Antikörpern untersucht wurden, fanden wir in 20 Seren definierbare Antikörper, in 14 Seren oligo- bzw. multispezifische Antikörper. Diesen 34 Seren (32,4%) mit sicherer Antikörperpersistenz stehen 58 Seren (55,3%) gegenüber ohne Persistenz der cytotoxischen Antikörper und 13 Seren (12,3%) mit unspezifischer Reaktion.

Tabelle 3: Häufigkeit der Persistenz von cytotoxischen HLA-Antikörpern in 105 Seren.

Untersuchte Seren		105	100,0%
Definierbare Antikörper		20	19,1%
stark positiv	14		
positiv	6		
Multispezifische Ak.		14	13,3%
Sichere Ak.-Persistenz		34	32,4%
Fragliche "		13	12,3%
Fehlende "		58	55,3%

Als Seren mit definierbaren Antikörpern bezeichnen wir solche, die eine Reaktionskombination mit den verschiedenen Testzellen aufweisen, die eine Zuordnung zu ein-

zelnen Antikörperspezifitäten zuläßt. Wir unterteilten die definierbaren Antikörper in zwei Gruppen, in Antikörper, deren Reaktion mit den Testzellen des korrespondierenden Merkmals auffallend stark positiv waren, und in Antikörper, die zwar eindeutig spezifizierbar waren, aber nicht in so ausgeprägtem Maße positiv reagierten. Maßgebliches Kriterium war der durchschnittliche Scorewert. In der ersten Gruppe traten durchweg Scorewerte zwischen 6/8 und 8 auf, in der zweiten auch zwischen 4/6 und 6. Als oligo- bzw. multispezifische Antikörper wurden solche gewertet, die mit einem Großteil der angebotenen Testzellen reagierten und so keine Identifizierung einzelner Antikörperspezifitäten zuließen.

3.2. Quantitative Titeruntersuchungen.

Neben dem Antikörpersuchtest nahmen wir an den Seren, die eine sichere Antikörperpersistenz aufweisen (34 Seren), eine quantitative Untersuchung vor, um die Titerstärke der noch vorhandenen Antikörper zu erfassen.
Die Titeruntersuchungen, jeweils in zwei Ansätzen mit verschiedenen Lymphozyten, die das korrespondierende Merkmal aufweisen, erstreckten sich auf folgende Verdünnungsstufen:

1 : 1	1 : 4
1 : 2	1 : 6
1 : 3	1 : 8

Bei einzelnen Seren untersuchten wir, wenn es angezeigt erschien, höhere Verdünnungsstufen, in keinem Fall konnte ein höherer Titer als 1 : 16 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse schlüsselten wir wie folgt auf: Von den 34 Seren weisen 11 einen durchschnittlichen Titer von 1 : 4 bis 1 : 8 auf, 17 einen Titer von 1 : 2 bis 1 : 4, und 6 Seren zeigen, obwohl im Screening positiv, keine nachweisbare Titerstärke. Es weisen also 1/3 der antikörperhaltigen Seren einen für Testseren noch relativ hohen Titer auf. Auffallend

ist, daß sich unter den 11 Seren mit einem Titer zwischen 1 : 4 und 1 : 8 vor allem solche mit definierbaren Antikörpern stark positiver Reaktion und multispezifische Antikörper befinden, bei den 17 Seren mit einem Titer zwischen 1 : 2 und 1 : 4 dagegen vor allem solche mit definierbaren Antikörpern schwach positiver Reaktion und unter den 6 negativen Seren vor allem solche mit multispezifischen Antikörpern. Es lassen sich also Parallelen zwischen qualitativer und quantitativer Untersuchung feststellen.

Tabelle 4: Titerstärke der antikörperpositiven Seren.

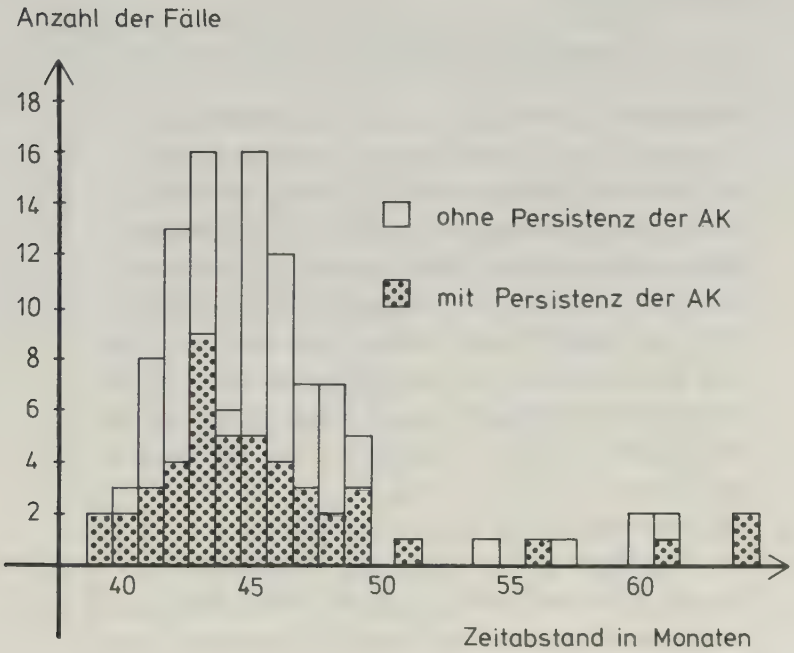
Titerstärke	Anzahl Seren	Prozent
1:4 - 1:8	11	32,3 %
1:2 - 1:4	17	50,0 %
negativ	6	17,7 %

3.3. Zeit zwischen den Untersuchungen.

Abbildung 3 gibt Aufschluß über die Zeitspanne zwischen den beiden Untersuchungen. Die erste Untersuchung fand 1971/72 im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchung statt (vgl. Brunner), bei der erneuten Untersuchung 1975/1976 baten wir den jeweiligen Hausarzt, bei den betreffenden Frauen ca. 10 ccm Blut abzunehmen.
Der größte zwischenzeitliche Abstand beträgt 64 Monate, der geringste 39 Monate. Die Graphik zeigt eine deutliche Häufung der Fälle mit 41 bis 49 Monate Abstand zwischen den Untersuchungen. Diese Häufung schlägt sich auch in der durchschnittlichen Dauer von 46 Monaten nieder. Weder bei Seren mit einer langen Zeitspanne zwischen den Untersuchungen, noch bei solchen mit einer kurzen, zeigt sich eine veränderte Persistenzhäufigkeit, verglichen mit dem

gesamten Untersuchungsgut.

Abbildung 3: Zeitabstand zwischen den Untersuchungen.



Zusammenfassend können wir feststellen:
Bei 105 Frauen, bei denen 1971/72 im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchung eine HLA-Immunisierung festgestellt wurde, konnten in 32 % der Fälle nach durchschnittlich 3 Jahren und 10 Monaten noch sicher cytotoxische Antikörper nachgewiesen werden.

3.4. Einflüsse auf die Persistenz und Auswirkungen der Persistenz.

Im Zusammenhang mit den anamnestischen Erhebungen untersuchten wir den möglichen Einfluß bestimmter Faktoren auf die Persistenz der Antikörper und Auswirkungen der Persistenz ihrerseits.

3.4.1. Spezifität der persistierenden Antikörper.

Ausgehend von der Frage, ob bestimmte Antikörperspezifitäten gehäuft persistieren, stellten wir die Häufigkeit der einzelnen Antikörperspezifitäten in den 105 Seren bei der ersten Untersuchung der Häufigkeit bei der jetzigen Untersuchung gegenüber und berechneten die relative Häufigkeit der Persistenz der einzelnen Antikörperspezifitäten. Da häufig Seren mit mehr als einer Antikörperspezifität vorkommen, also bi- oder oligospezifische Seren, ist die Summe der Häufigkeiten der einzelnen Spezifitäten größer als die Anzahl der Frauen (= 105), bzw. die Anzahl der antikörperhaltigen Seren (= 34).
Bei Tabelle 5 fällt auf, daß die Antikörper des B-Locus sowohl häufiger im Untersuchungsgut vertreten sind, als auch in vermehrtem Maße persistieren. Diese Verschiebung der Häufigkeit zugunsten des B-Locus ist statistisch nicht signifikant ($\chi^2 = 0,6$).
Die prozentual höchste Persistenzquote fanden wir bei B 17 mit 75 %, gefolgt von B 8 mit 66 % und B 7 mit 36 %. In der Reihenfolge der größten prozentualen Häufigkeit folgen Bw 40, Bw 35, B 5, B 14 und B 27.
Die relativen Häufigkeiten und die Persistenz der einzelnen Antikörper des A-Locus lassen sich für einen Vergleich nicht verwenden, da diese Antikörper in den 105 Seren in zu geringer Anzahl vorhanden sind. Am aussagekräftigsten ist noch der Wert für A 2 mit 15 %.
Die Persistenz von B 17 ist im Verhältnis zu den anderen

Antigenen des B-Locus statistisch signifikant erhöht: $\chi^2 = 7,6$; $p = 0,01$. Für B 8 beträgt der χ^2 - Wert 6,1 und $p = 0,025$.

Tabelle 5: Persistenzhäufigkeit der einzelnen Spezifitäten.

Spez.	1971/2	1976	%	Spez.	1971/2	1976	%
A 1	5	-	-	B 5	28	7	25
A 2	13	2	15	B 7	14	5	36
A 3	2	1	-	B 8	9	6	66
A 9	1	-	-	B12	10	1	10
A10	3	1	-	B13	7	1	14
A11	1	-	-	B14	4	1	25
A28	2	1	-	B17	8	6	75
				B27	13	3	23
				Bw35	16	5	31
				Bw40	6	2	33
				Bw15	8	1	12
				Bw16	1	-	-
				Bw18	5	-	-
				Bw21	12	2	16
				Bw22	7	1	14
	27	5			148	41	

3.4.2. Vergleich der Persistenz (1972 - 76) mit der Antigenität (1972).

Vergleicht man die relative Häufigkeit der Antikörperpersistenz der einzelnen Spezifitäten mit ihrer Antigenität - von B. Brunner (15) 1972 am größtenteils selben Untersuchungsgut nach der Methode von 1.3.2.2. berechnet - so zeigt sich keine positive Korrelation zwischen der Antigenität der Merkmale und der prozentualen Häufigkeit der Persistenz des entsprechenden Antikörpers.

Tabelle 6: Vergleich der Persistenz mit der Antigenität.

Spezifität	Antigenität	relat. Persistenz	absolute P.
B 5	0,1111	25 %	7 von 28
A 2	0,0808	15 %	2 von 13
B12	0,0480	10 %	1 von 10
B 7	0,0417	35 %	5 von 14
Bw35	0.0374	31 %	5 von 16
A 9	0,0282	-	-
B 8	0,0264	66 %	6 von 9
A 1	0,0161	-	-
A 3	0,0121	50 %	1 von 2
B17	?	75 %	6 von 8

B 8 zum Beispiel hat nur eine Antigenität von 0,0264, die Antikörper gegen B 8 persistieren dagegen in 66 % der Fälle. Umgekehrt persistieren die korrespondierenden Anti-

körper zu B 5, das die stärkste Antigenität aufweist, nur in 25 % der Fälle. Insgesamt erkennt man in der Tabelle 6, daß fast alle Antikörper mit geringer Antigenität eine relativ große Persistenzhäufigkeit haben.

3.4.3. Veränderungen des Antikörperspektrums.

Ein Vergleich des Antikörperspektrums der einzelnen Seren von 1971/72 und 1976 zeigt nicht nur, wie schon Tabelle 3, daß in 55 % (= 58 Seren) ein Verlust des Spektrums und damit keine Antikörperpersistenz vorhanden ist, sondern zeigt auch, daß von den 47 Seren, die 1976 noch ein Spektrum aufweisen, in nur 6 Fällen (ca. 13 % der antikörperpositiven Seren) eine Einengung des Spektrums, gleichbedeutend einem Verlust an bestimmten Antikörperspezifitäten, festzustellen ist. In 14 Fällen ist das Spektrum gleichgeblieben, in 14 weiteren Fällen kamen neue Antikörperspezifitäten hinzu, wobei es sich meistens um Antikörper gegen Antigene derselben kreuzreagierenden Gruppe handelte, der auch das Antigen, das die ursprüngliche Sensibilisierung hervorgerufen hat, entstammt.

Tabelle 7: Vergleich des Antikörperspektrums 1971/72 und 1976

Spektrum	Anzahl	Prozent
Verlust	58	siehe Tab. 3
eingeengt	6	13 %
gleich	14	30 %
erweitert	14	30 %
unspezifisch	13	27 %
	47	100 %

3.4.4. Zwischenzeitlicher Antigenkontakt.

Durch die Fragebögen verfügen wir über Angaben, welche potentiellen Antigenstimuli zwischen den Untersuchungen stattgefunden haben und in wieviel Fällen. Als Antigenkontakt kommen in Frage:

1) Schwangerschaft
2) Transfusion

Eine Schwangerschaft trat bei den 105 Frauen zwischen 1971/72 und 1976 in 21 Fällen auf (15 Geburten, 6 Aborte), Transfusionen bekamen in diesem Zeitraum nur 3 Frauen.

Tabelle 8: Zwischenzeitlicher Antigenkontakt

AG.-Kontakt	Anzahl	Persistenz bei
Geburt	15	5
Abort	6	3
Transfusion	3	3

Alle drei transfundierten Frauen weisen bei der jetzigen Untersuchung Antikörper auf, wobei in zwei Fällen 1976 multispezifische Antikörper vorliegen, während die Antikörper 1971/72 definierbar waren, in einem Fall blieb die Antikörperspezifität unverändert.
Bei den Frauen, die zwischen 1971/72 und 1976 eine Geburt aufweisen, war dies im Durchschnitt die dritte Schwangerschaft (9 mal war es die zweite, 4 mal die dritte und je 1 mal die fünfte bzw. die achte Schwangerschaft). Eine Persistenz in 1/3 der Fälle (5 von 15) bei durchschnittlich 3 Schwangerschaften stimmt mit den Werten aus Tabelle 10 überein. Ähnliche Verhältnisse liegen auch bei den 6 Frauen mit einem zwischenzeitlichen Abort vor. Bei

ihnen war diese Schwangerschaft im Durchschnitt die vierte, eine Persistenz der Antikörper trat in 50 % der Fälle auf.

3.4.5. Einfluß von Schwangerschaften auf die Spezifität der persistierenden Antikörper.

Vergleicht man die Spezifität der Antikörper mit der Anzahl aller Schwangerschaften bei jeder der 105 Frauen, so stellt man fest, daß Frauen mit einer Persistenz von oligo- bzw. multispezifischen Antikörpern im Durchschnitt mehr Schwangerschaften, nämlich 4,4 , hinter sich haben, als Frauen mit einer Persistenz von monospezifischen Antikörpern (2,8 Schwangerschaften).

Tabelle 9: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Spezifität der persistierenden Antikörper.

- Frauen mit oligo- bzw. multispezifischen Antikörpern (14) : 4,4 Schwangersch.
- Frauen mit definierbaren Antikörpern stark positiver Reaktion (6) : 4,0 Schwangersch.
- Frauen mit definierbaren Antikörpern schwach positiver Reaktion (14) : 2,8 Schwangersch.

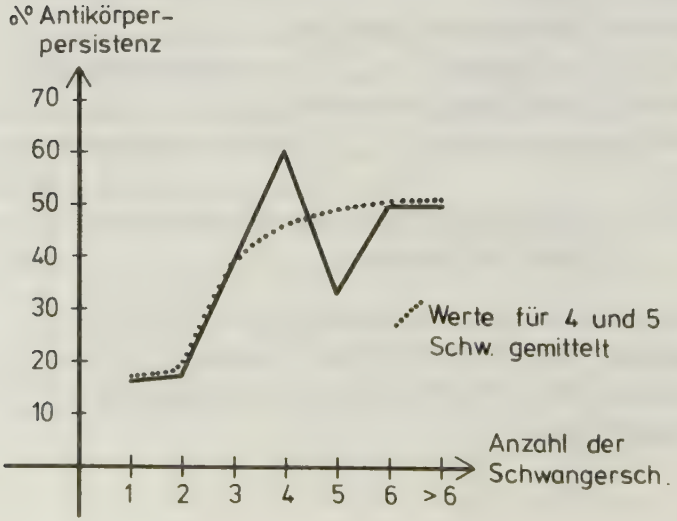
3.4.6. Einfluß der Anzahl der Schwangerschaften auf die Häufigkeit der Persistenz.

Wir ordneten die 105 Frauen nach der Anzahl der stattgefundenen Schwangerschaften (1 bis 6 und mehr als 6) und errechneten die relative Häufigkeit an Antikörperpersistenz in diesen Gruppen.

Tabelle 10: Persistenzhäufigkeit in Abhängigkeit von der Anzahl der Schwangerschaften.

Anzahl der Schwangerschaften	Antikörperpositive Seren 1971/72	1976	Prozent
1	6	1	16 %
2	35	6	17 %
3	33	13	39 %
4	10	6	60 %
5	10	3	33 %
6	6	3	50 %
6	4	2	50 %

Abbildung 4: Prozentuale Antikörperpersistenz in Abhängigkeit von der Anzahl der Schwangerschaften.



Die relative Häufigkeit an Frauen mit einer Antikörperpersistenz liegt für 1 bzw. 2 Schwangerschaften bei 16 % bzw. 17 %, steigt dann bis auf 60 % bei 4 Schwangerschaften an und erreicht für 6 bzw. mehr als 6 Schwangerschaften den Wert von 50 %. Der plötzliche Anstieg bei 4 Schwangerschaften auf 60 % und der Abfall auf 33 % bei 5 Schwangerschaften ist zufälliger Natur aufgrund der geringeren Fallzahl in diesem Bereich.
Die Persistenzhäufigkeit ist bei Multiparae (> 4 Schwangerschaften) gegenüber Erst- und Zweitpara nicht statistisch signifikant erhöht ($\chi^2 = 2,5$).
Mittelt man die Werte für 4 und 5 Schwangerschaften, so läßt sich in der Graphik (Abb. 4) ein kontinuierlicher Anstieg der Persistenzquote mit steigender Anzahl der Schwangerschaften zeigen.

3.4.7. Abhängigkeit der Persistenzhäufigkeit vom Alter der Mutter.

Für diese Fragestellung teilten wir unser Untersuchungsgut nach dem Alter der Frauen in Gruppen zu je 5 Jahren auf und ordneten den Gruppen die entsprechenden Fälle zu, die auch 1976 Antikörper aufweisen. Die 9 jüngsten Frauen waren 1976 im Alter von 21 - 25 Jahren, am stärksten war die Gruppe zwischen 31 und 35 Jahren vertreten, nämlich 30 mal. 16 Mütter waren älter als 40 Jahre. Der relative Prozentsatz der Antikörperpersistenz steigt kontinuierlich mit dem Alter der Mutter an. Gleichzeitig berechneten wir die durchschnittliche Anzahl an Schwangerschaften in jeder dieser Gruppen. Sie steigt parallel zu den Persistenzwerten an. Es läßt sich somit nicht feststellen, ob auch das Alter der Mutter oder nur die Anzahl der Schwangerschaften für den Anstieg der Persistenzhäufigkeit mit dem Alter der Mutter verantwortlich ist.

Tabelle 11: Persistenz in Abhängigkeit vom Alter der Mutter.

Alter der Mutter 1976	Antikörperpos. Seren 1971/2	1976	Prozent Persistenz	durchschnittl. Zahl d. Schw.
< 20	-	-	-	-
21 - 25	9	0	0	2
26 - 30	24	5	21	2,3
31 - 35	30	9	30	2,7
36 - 40	23	10	43	4,1
> 40	16	8	50	4,7

Eine relative Persistenzhäufigkeit von ca. 50 % zeigt sich damit sowohl bei Frauen über 40 Jahren, die eine durchschnittliche Anzahl von 4,7 Schwangerschaften aufweisen (Tabelle 11), als auch bei Frauen mit 6 und mehr Schwangerschaften (Tabelle 10), die durchschnittlich ein Alter von 41 Jahren haben.

3.5. Differenzierung der Schwangerschaften.

Aus den gleichzeitig über Fragebögen ermittelten anamnestischen Befunden konnten wir folgende für unsere Untersuchungen interessante Informationen gewinnen: Die 105 Frauen waren bis zur zweiten Untersuchung 1976 insgesamt 334 mal schwanger gewesen, auf eine Frau kommen somit im Durchschnitt drei Schwangerschaften. Wir unterteilten die Schwangerschaften in Geburten, lebensunfähige Frühgeburten und in Aborte. Von den 303 Geburten sind 187 vor der Untersuchung auf eine HLA-Sensibilisierung im Jahre 1971/72 erfolgt, 101 Geburten waren die Folge der Schwangerschaf-

Tabelle 12: Unterteilung der Schwangerschaften bis 1976 in Geburten, lebensunfähige Frühgeburten und Aborte.

334 Schwangerschaften bis 1976 bei den 105 untersuchten Fällen.

303 Geburten

187 Geburten vor Untersuchung auf HLA-Sensibilisierung.

184 Kinder leben

3 Kinder gestorben

101 Geburten, während deren Schwangerschaft ein Nachweis der HLA-Sensibilisierung erfolgt war.

15 Geburten nach vorausgegangenem Nachweis einer HLA-Sensibilisierung.

4 Lebensunfähige Frühgeburten

3 vor Nachweis der HLA-Sensibilisierung.

1 während deren Schwangerschaft ein Nachweis der HLA-Sensibilisierung erfolgt war.

26 Aborte

17 Aborte vor Untersuchung auf HLA-Sensibilisierung.

3 Aborte, während deren Schwangerschaft ein Nachweis der HLA-Sensibilisierung erfolgt war.

6 Aborte nach vorausgegangenem Nachweis der HLA-Sensibilisierung.

1 zur Zeit bestehende Schwangerschaft.

ten, während denen ein Nachweis der HLA-Sensibilisierung gelang und 15 Geburten sind für den Zeitraum zwischen 1971/72 und 1976 zu verzeichnen, also nach vorausgegangenem Nachweis der Sensibilisierung. 4 Frauen hatten eine Frühgeburt vor 1971/72 und eine Frau unmittelbar nach dem Nachweis der Sensibilisierung. Von den 26 Aborten entfallen 17 in die Zeit vor der ersten Untersuchung, in 3 Fällen führte die Schwangerschaft, die Anlaß zur Untersuchung gewesen war, zu einem Abort und in 6 Fällen trat der Abort bei einer Schwangerschaft nach erwiesener HLA-Sensibilisierung zwischen 1971/72 und 1976 auf.

3.6. Einfluß der Persistenz von Antikörpern auf Aborthäufigkeit und Geschlechtsverteilung.

Aufgrund der Informationen der Fragebögen interessierten uns vor allem zwei Fragestellungen:

3.6.1. Hat die HLA-Sensibilisierung und die Persistenz der Antikörper einen Einfluß auf die Abortenhäufigkeit?

Wir faßten Aborte und lebensunfähige Frühgeburten zu einer Gruppe zusammen, unterteilten das Untersuchungsgut in dieselben Gruppen wie in Tabelle 12 und erhielten folgende Zahlenwerte:

Tabelle 13: HLA-Sensibilisierung und Abortenhäufigkeit.

	vor 1971/2	1971/2	1971/2 bis 1976
Schwangerschaften	207	105	21
Aborte und lebensunfähige Frühgeburten	20	4	6

Um eine Aussage über den Einfluß einer HLA-Sensibilisierung treffen zu können, stellten wir die Fälle, in denen der Foet auf einen HLA-sensibilisierten Organismus der Mutter traf, und die Fälle, in denen dies nicht bekannt ist, gegenüber. Vor einer nachgewiesenen HLA-Immunisierung sind 20 von 207 Schwangerschaften durch einen Abort abgebrochen worden. Die Schwangerschaften, während denen eine Sensibilisierung nachgewiesen werden konnte, führten in 4 Fällen zu einem Abort oder einer lebensunfähigen Frühgeburt. Dabei läßt sich heute nicht mehr feststellen, in wieviel Prozent dieser insgesamt 312 Schwangerschaften der Foet auf einen sensibilisierten Organismus traf. Maßgeblich dafür sind die Ergebnisse einer Untersuchung vor der jeweiligen Schwangerschaft. Diese Voraussetzung ist bei den 6 Aborten der 21 Schwangerschaften zwischen 1971/72 und 1976 erfüllt.

Für den Signifikanztest lassen sich folgende Vergleichsgruppen einander gegenüberstellen:

-- Bei 312 Schwangerschaften ohne vorhergehenden Nachweis der Sensibilisierung traten 24 Aborte auf (7,0 %).
-- Bei 21 Schwangerschaften mit vorhergehendem Nachweis der Sensibilisierung traten 6 Aborte auf (28,5 %).

Der Signifikanztest ergibt für χ^2 einen Wert von 8,5 ($p = 0,005$). Die Abortenhäufigkeit ist somit nach dem Nachweis einer HLA-Sensibilisierung statistisch signifikant erhöht.

3.6.2. Haben HLA-Antikörper und ihre Persistenz einen Einfluß auf die Geschlechtsverteilung ?

Vor der ersten Untersuchung hatten die 105 Frauen zusammen 187 Geburten, darunter 75 männliche und 70 weibliche, also ein fast ausgewogenes Verhältnis des Geschlechts. Von den 101 Geburten, während deren Schwangerschaft eine HLA-Sensibilisierung nachgewiesen wurde, waren 47 männlich und

30 weiblich. Schließlich fanden 15 Geburten in dem Zeitraum zwischen 1971/72 und 1976 statt, 10 waren männlich und 4 weiblich. Es zeigt sich zwar eine Verschiebung des Verhältnisses männlich zu weiblich zugunsten der männlichen Geburten, sie ist aber nicht statistisch signifikant ($\chi^2 = 0,45$).
Dennoch läßt sich aus der Zusammenstellung folgendes ablesen: Männliche Foeten verursachen häufiger eine Sensibilisierung im HLA-System als weibliche. Außerdem treten nach einer derartigen Sensibilisierung vermehrt männliche Geburten auf.

Tabelle 14 : Verhältnis männlicher und weiblicher Geburten in Abhängigkeit von einer Sensibilisierung im HLA-System.

	vor 1971/72	1971/72	nach 1971/72
Geburten	187	101	15
männliche	75	47	10
weibliche	70	30	4
nicht angegeben	42	24	1

Ein Vergleich der Antikörperspezifitäten bei den Schwangerschaften, die eine HLA-Sensibilisierung aufweisen, zeigt getrennt nach dem Geschlecht folgendes Bild:

a) Bei Schwangeren mit männlichen Foeten fanden wir die Spezifitäten folgender cytotoxischer Antikörper erhöht:

	♂	♀		♂	♀
A 1 :	5	0	B 8 :	5	4
B27 :	10	3	Bw22 :	5	2
B 7 :	10	4			

b) Bei Schwangeren mit weiblichen Foeten traten folgende Antikörperspezifitäten gehäuft auf:

	♂	♀		♂	♀
Bw35:	4	12	Bw15 :	3	5
B 5 :	10	18	Bw40 :	1	5
B14 :	1	3			

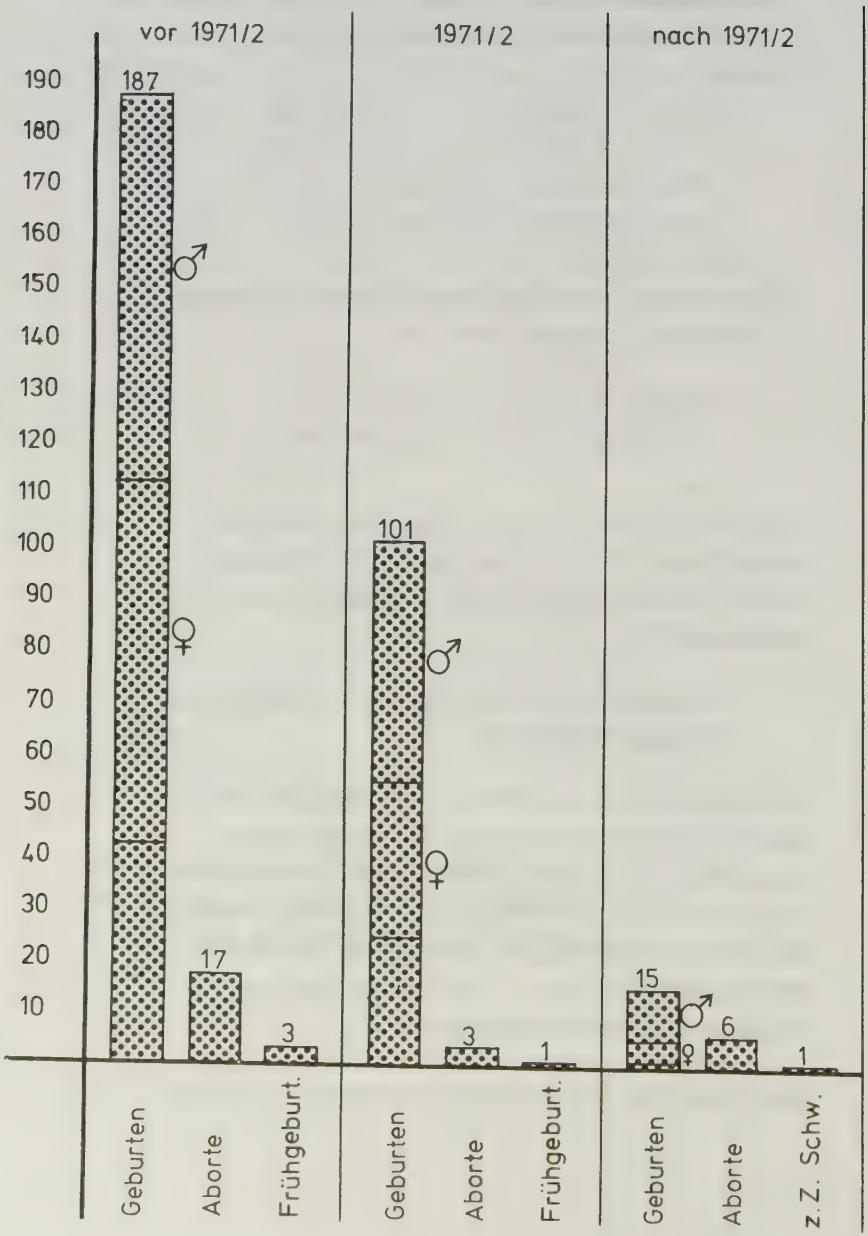
In Abbildung 5 sind in Bezug zur Sensibilisierung die Veränderungen der Abortenrate und des Verhältnisses von männlichen und weiblichen Geburten graphisch übersichtlich dargestellt.

3.7. Charakteristika des HLA-Systems im Vergleich zum Rh-System als Beispiel.

Die Bildung von HLA-Antikörpern in schwangeren Frauen wird von vielen Autoren (19, 38, 75) mit der Rhesus-Immunisierung verglichen. Obwohl gewisse Parallelen vorliegen, wenn auch die Verhältnisse infolge Polymorphismus und Serieneinteilung der Merkmale im HLA-System ungleich komplizierter sind, so gibt es doch entscheidende Unterschiede zwischen beiden Systemen.

Sensibilisierung: Der Durchtritt von Leukozyten, die zur

Abbildung 5: Abortenrate und Verhältnis von männlichen und weiblichen Geburten.



HLA-Sensibilisierung führen können, durch die Gefäßwand stellt einen aktiven Prozeß dar, dagegen treten die Erythrozyten rein passiv durch foetomaternale Mikroshunts in den mütterlichen Kreislauf über. Die Antigene des HLA-Systems stellen schon frühzeitig im Verlauf einer Schwangerschaft, unter Umständen schon in der ersten, einen sensibilisierenden Faktor für den fremden mütterlichen Kreislauf dar. Dies wird durch das Auftreten von HLA-Antikörpern bei der Mutter schon frühzeitig in der Schwangerschaft bestätigt. Dagegen reichen die im Laufe der ersten Schwangerschaft übertretenden kleinen Mengen foetaler Erythrozyten offenbar nicht aus, um zu einer Erstimmunisierung der Mutter bis zum Zeitpunkt der Geburt zu führen. Ein genügend großer Anteil an foetalen Erythrozyten tritt in den meisten Fällen erst unter der Geburt auf die Mutter über und kann dann eine Erstimmunisierung hervorrufen. Somit können Schäden erst bei dem nächsten Kind auftreten, sofern auch bei dieser Schwangerschaft eine Rh-Inkompatibilität vorliegt (90).

Häufigkeit der Sensibilisierung: Der bedeutend höhere Grad der multiplen Allelie, bzw. die größere Anzahl der Spezifitäten erklärt, daß die Sensibilisierung im HLA-System in 20 - 40 % der Schwangerschaften zu erwarten ist, im Rh-System dagegen nur in 0,5-1 %. Neben dem Polymorphismus werden für die unterschiedliche Sensibilisierungsrate noch diskutiert die unterschiedliche Antigenität und Frequenz der Antigene in der Population, eine bessere Möglichkeit in den mütterlichen Kreislauf zu gelangen und die unterschiedliche Reagibilität des Empfängers (75).

Auswirkungen: Rh-Merkmale findet man nur auf Erythrozyten und Leukozyten. Sie erleiden eine starke Schädigung bei Vorliegen einer Sensibilisierung, da sie nicht in der Lage sind, übertretende Antikörper durch Absorptsionsvorgänge quantitativ zu eliminieren. Demgegenüber lassen sich HLA-

Determinanten im ganzen Organismus nachweisen, was eine hohe Abbindungsmöglichkeit zur Folge hat und damit, so wird vermutet, keine derart klinisch relevanten Schäden zeigt, wie eine Rh-Immunisierung.

Gegenseitiger Einfluß: Ahrons und Murray et al. (2, 68) konnten zeigen, daß Rh-immunisierte Frauen eine höhere Frequenz an leukozytären Antikörpern aufweisen, als Frauen ohne Rhesus-Antikörper. Bertrams (11) fand dazuhin, daß die Wahrscheinlichkeit einer HLA-Sensibilisierung proportional zum Rh-Titer steigt. HLA-Antikörper allein werden als harmlos angesehen, bei gleichzeitiger Rh-Inkompatibilität tritt aber eine höhere Rate an foetaler Erythroblastose auf als bei alleiniger Rh-Sensibilisierung (37).
Als Ursache dieser Zusammenhänge wird diskutiert:

a) Der Foet weist infolge einer Rh-Immunisierung eine veränderte HLA-Sensibilität auf, dabei kommt es womöglich zum Bruch der Placentabarriere.
b) Die Vorläufer der Erythrozyten, die bei der Erythroblastose gehäuft auftreten, tragen im Gegensatz zu den Erythrozyten noch viele HLA-Determinanten und stellen einen zusätzlichen Stimulus der Lymphozytenantikörper dar.

Antikörperspezifität: Analoge Verhältnisse herrschen in beiden Systemen hinsichtlich der Zugehörigkeit zur Immunglobulinklasse. Sowohl Rh-, als auch HLA-Antikörper gehören vorwiegend der IgG- und nur selten der IgM-Klasse an. Dagegen sind die HLA-Antikörper der Schwangerschaft vor allem komplette Antikörper, während die Rh-Antikörper vor allem inkomplett sind (90), was für die Nachweismethode von Bedeutung ist.

4. DISKUSSION

4.1. Persistenz cytotoxischer HLA-Antikörper.

Das Ziel unserer Untersuchungen war, entsprechend einem repräsentativen Querschnitt, die Seren von Frauen, die vor 3 - 4 Jahren im Rahmen einer Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchung cytotoxische HLA-Antikörper in ihrem Serum aufgewiesen haben, erneut auf Antikörper zu untersuchen. Wir gingen dabei von der Frage aus, die vor allem für die Praxis der HLA-Serologie von Relevanz ist, ob es sich hinsichtlich Häufigkeit, Titer und Spezifität der persistierenden Antikörper lohnt, Schwangere, deren Seren sich als Testseren bewährt haben, nach 3 - 4 Jahren nochmals um eine Blutprobe zu bitten.

In 34 von 105 Fällen (= 32 %) fanden wir cytotoxische HLA-Antikörper noch durchschnittlich 3 Jahre und 10 Monate nachdem eine Sensibilisierung im HLA-System festgestellt worden war. 20 Seren enthielten dabei definierbare, 14 multispezifische Antikörper.

Das Auftreten von multispezifischen Antikörpern als Folge einer Schwangerschaft bedarf einer Erklärung, da ein und derselbe Vater höchstens vier verschiedene HLA-Merkmale aufweisen, eine Frau durch Schwangerschaften also theoretisch nur gegen maximal vier verschiedene Merkmale sensibilisiert werden kann. Zu bedenken sind zum einen die praktischen Grenzen der Methode. Wenn drei oder vier HLA-Determinanten auf dem Chromosom des Vaters vorliegen, die auch auf vielen Testlymphozyten vorkommen, so erhält man mit dem Serum der Mutter derart häufig eine positive Reaktion, daß es nicht möglich ist, einzelne Antikörperspezifitäten zu identifizieren. Dies findet man vor allem in den Fällen, in denen die Antigene beider Loci des väterlichen Haplotyps immunisierend gewirkt haben und beide Antikörper kreuzreagierend ausgebildet wurden (15). Zum

anderen muß man in Betracht ziehen, daß der Organismus auf einen spezifischen Reiz auch zunächst mit einer unspezifischen Reaktion antworten kann. So konnte Brunner (15) zeigen, daß bei einigen Schwangeren, die zunächst ein breites Antikörperspektrum aufgewiesen haben, gegen Ende der Gravidität eine Spezifität zu erkennen war.

Um unsere Ergebnisse mit denen anderer Autoren besser vergleichen zu können, haben wir alle vorliegenden, einschließlich den unsrigen, in einer Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 15: Persistenz cytotoxischer HLA-Antikörper.

	Ak. bei	Persistenz über:				
	Geburt	6 Monate	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre	Max.
Bertrams (9)	11	6=54%	5=45%			
Nymand (71)	265 1. Para	8=3,1%				
Savi (84)			46% 10von23	17% 5von29	14% 3von21	31Jahre
Tongio (98)	20		11=55%	2=10%	1=5%	5Jahre
Brunner (15)/ Haug	105				34=32%	

Bertrams (11) fand, daß mit einer Persistenz von leukozytären Antikörpern nach der Geburt in 20-30% der Fälle zu rechnen ist, macht über die Dauer der Persistenz jedoch keine Angaben. Untersuchungen, die sich speziell mit der Persistenz cytotoxischer HLA-Antikörper über Jahre befassen, liegen unseres Wissens nur wenige vor.

So untersuchte Tongio (98) 24 Fälle und fand nur in 3 davon eine Persistenz über annähernd 3 Jahre. Faßt man bei Savi (84) die Ergebnisse seiner Untersuchungen über den Zeitraum von 3 - 4 Jahren nach einer HLA-Sensibilisierung zusammen, erhält man eine Persistenz von cytotoxischen Antikörpern in 13 % der untersuchten Fälle.
Für die Persistenz über 3 Jahre erhalten wir einen um ein Vielfaches höheren Wert als Tongio und Savi, allerdings basieren deren Ergebnisse auf einer sehr geringen Anzahl an untersuchten Fällen.

4.2. Vorstellungen über die Ursachen der Persistenz.

Wie kann man sich eine Persistenz von Antikörpern über 3-4 Jahre, laut Angaben aus der Literatur sogar über maximal 31 bzw. 39 Jahre (75, 84) erklären? Das ursprünglich sensibilisierende Agens, der Foet mit seinen inkompatiblen leukozytären Antigenen kann nur bis zur Geburt als Antigenstimulus wirken, dann geht, findet keine erneute Stimulation statt, die Antikörperbildung mit dem Zugrundegehen der letzten Stammzelle, die die entsprechende Information enthält, zu Ende.
Als mögliche Erklärung für eine langdauernde Persistenz wird von Tongio (98) diskutiert, daß weiterhin ein immunisierender Prozeß besteht, etwa eine Stimulation durch mikrobielle Antigene, die eine dem HLA-System analoge Struktur aufweisen. Auch Bachner (8) erscheint ein derartiges Verhalten der Antikörper ohne wiederholten Antigenkontakt mit HLA-Material im Sinne einer Boosterung unwahrscheinlich. Nach ihren Untersuchungen sind dafür in Erwägung zu ziehen:

1) Boosterungen durch Spermien und / oder zelluläre Ejakulatbeimengungen.
2) Unerkannte Frühaborte.

Der fortlaufenden Restimulation durch Sperma, vor allem bei jahrzehntelanger Persistenz wird auch von anderen Autoren Bedeutung beigemessen (2, 9).

Interessant sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen von Stolp (91) und Bachner (8) über die weibliche Sterilität. Sie konnten das Auftreten von Histokompatibilitäts-Antikörpern im Serum von Frauen ohne vorausgegangene Schwangerschaft oder Transfusion beobachten, wobei sie einen fortlaufenden Kontakt mit HLA-antigenem Material des männlichen Partners ursächlich in Erwägung ziehen. Dafür spricht auch die Beobachtung von Ahrons (2), daß man nach einem Coitus in der Peritonealhöhle der Frau Leukozyten mit Antigendeterminanten des Mannes finden kann. Sterile und infertile Frauen weisen eine höhere Rate leukozytärer Antikörper auf als fertile Frauen. Bei primärer Sterilität ist in 18,5% der Fälle mit HLA-Antikörpern zu rechnen (Kontrollgruppe 4,5 %), bei sekundärer Sterilität in 27,3% der Fälle (Kontrollgruppe 5,6 %). Immunologische Faktoren scheinen also einen Einfluß auf die weibliche Sterilität zu haben.
Diese Ergebnisse sprechen auf der einen Seite für eine weitere Möglichkeit der Sensibilisierung (vgl.: 1.6.1.) auf der anderen Seite liefern sie eine Erklärung dafür, wie der Zustand der Sensibilisierung aufrechterhalten werden kann. Ist allein das Antigenmaterial des Vaters für eine Sensibilisierung verantwortlich, so müßten bei jeder Mutter gegen alle Determinanten des Vaters Antikörper vorliegen, was jedoch nicht der Fall ist. Es scheint, als ob bis auf Ausnahmen für die Sensibilisierung selbst eine massive Konfrontation mit Antigenmaterial, zum Beispiel in Form einer Schwangerschaft, notwendig ist, für die Aufrechterhaltung des Antikörperspiegels aber nur geringe Mengen, wie sie zum Beispiel durch Ejakulatbeimengungen in den weiblichen Organismus gelangen können. Als derartige Ausnahmen kann man Verhältnisse analog denen bei einer Panne der Plazentabarriere in Betracht ziehen, die dann bei sterilen Frauen zu einer Immunisierung führen können.

Auch die Ergebnisse unserer Untersuchung sprechen dafür,

daß die Sensibilisierung nur unter bestimmten Voraussetzungen aufrechterhalten werden kann, daß wiederholte Restimulationen dazu notwendig sind. Unabhängig von einem massiven Antigenkontakt in Form einer Schwangerschaft oder Transfusion kann es zu einer Persistenz oder einem Verlust an Antikörper kommen. So scheinen bei einigen Frauen Verhältnisse vorzuliegen, die eine Restimulation ermöglichen oder erleichtern und damit zu einer Persistenz der Antikörper führen, während bei anderen Frauen ohne diese Voraussetzungen für eine Persistenz die Antikörper schon kurz nachdem das sensibilisierende Agens zu wirken aufgehört hat, verschwinden.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, warum nicht alle Schwangeren einer Sensibilisierung unterliegen , bzw. eine Persistenz von Antikörpern aufweisen. Die Tatsache, daß trotz Vorliegen einer Inkompatibilität häufig keine Immunisierung eintritt, erklärt Nymand (71) mit der Existenz kreuzreagierender Gruppen. Wenn die Antigene von Mutter und Kind zwar verschieden, aber der gleichen kreuzreagierenden Gruppe angehören, so kommt es normalerweise zu keiner Sensibilisierung. Eine derartige Toleranz kann möglicherweise auch gegen Antigene, die nur in schwacher Ausprägung vorliegen, bestehen oder unter bestimmten Immunitätsverhältnissen bei der Mutter. Außerdem hat nicht jede Antigenkonstellation die gleiche immunisierende Potenz. So spricht Bertrams (9) den Leukozyten immunogene oder tolerogene Wirkung zu und erklärt damit das unterschiedliche Verhalten der Antikörper nach der Geburt. Auch der Enhancement-Effekt, den Ahrons (2) als Möglichkeit für das Überleben des Foeten als Allotransplantat diskutiert, könnte die Ursache dafür sein, daß Antikörper nur selten auftreten, daß sie am foetalen Gewebe (Placenta) fixiert werden und somit nicht nachweisbar sind (vgl. 1.6.2.4.1.) (65) oder nur in so niedrigem Titer, daß die Untersuchungsmethoden zu unspezifisch dafür sind.

4.3. Untersuchungen im Zusammenhang mit der Persistenz.

Wenn auch unbekannt ist, durch welche Mechanismen die Antikörperpersistenz zustandekommt, bleibt bestehen, daß sie nicht in allen Fällen vorkommt und die Antikörper schon kurz nach der Geburt verschwinden können. Bei einem derart unterschiedlichen Verhalten der Antikörper ist es interessant zu wissen, unter welchen Bedingungen die Wahrscheinlichkeit für eine Antikörperpersistenz ansteigt und welche Folgen dadurch entstehen können.

4.3.1. Anzahl der Schwangerschaften: Wir fanden, daß mit steigender Anzahl der Schwangerschaften die Häufigkeit der Persistenz zunimmt. Dieser Anstieg ist recht deutlich, von 16 bzw. 17 % bei ein bzw. zwei Schwangerschaften steigt die Persistenz bis auf 50 % der Fälle bei sechs und mehr Schwangerschaften. Einen entsprechenden Anstieg, allerdings bei niedrigeren Werten, fand auch Savi (84). Bei ihm wiesen Frauen mit ein oder zwei Kindern in 7% eine Persistenz cytotoxischer Antikörper auf, Frauen mit mehr als zwei Kindern in 11%. Der Wert für mehr als zwei Kinder liegt in unseren Untersuchungen mehr als dreifach so hoch. Durch wiederholten massiven Antigenkontakt, und als solcher ist die Schwangerschaft zu verstehen, nimmt nicht nur die Wahrscheinlichkeit einer Sensibilisierung zu, sondern auch, daß eine vorliegende Immunisierung geboostert und damit eine lange Persistenz der Antikörper möglich wird.

4.3.2. Alter der Mutter: Zwischen dem Alter der Mutter und der Persistenzhäufigkeit besteht ebenfalls eine positive Korrelation. Da die Anzahl der Schwangerschaften natürlicherweise mit dem Alter der Mutter ansteigt, wie sich in den einzelnen Altersgruppen zeigt, läßt sich der Anstieg der Persistenzhäufigkeit, wenn überhaupt, so doch nicht ausschließlich auf das Alter der Mutter zurück-

führen. Zu diskutieren wäre in diesem Rahmen, ob mit dem Alter der Mutter Veränderungen im Immunsystem auftreten, die eine lange Persistenz leichter ermöglichen.

4.3.3. Spezifität der Antikörper: Durch wiederholten Antigenstimulus wird die Spezifität der persistierenden Antikörper geringer, bzw. das Spektrum breiter. Dies läßt sich anhand von zwei Korrelationen verdeutlichen.

a) Frauen mit multispezifischen Antikörpern weisen im Durchschnitt eine deutlich höhere Anzahl an Schwangerschaften auf (4,4), als Frauen mit monospezifischen Antikörpern (2,8). Zu gleichen Ergebnissen hinsichtlich der Veränderungen der Spezifität mit steigender Anzahl der Schwangerschaften in Richtung Polyspezifität kommen auch andere Autoren (10, 11, 97). Die Ursache liegt darin, daß in der ersten Schwangerschaft im allgemeinen nicht gegen alle inkompatiblen Antigene Antikörper gebildet werden. Dazu sind meist mehrere Stimuli notwendig (11), wobei nicht nur eine qualitative Änderung (Polyspezifität) sondern auch eine quantitative erzielt wird, indem der Titer ansteigt.

b) Ein Verlust an Spezifität tritt deutlich und schon nach wenigen Expositionen durch eine Transfusion auf. Dies können wir, wenn auch nur an drei Fällen, verdeutlichen. In zwei Fällen war ein früher monospezifisches Serum nach 4 Jahren multispezifisch, in einem Fall blieb die Spezifität unverändert. Wie Hammond (35) berichtet, tritt dieser Verlust an Spezifität auch bei Transfusionen desselben Spenders ein, was, wie bereits erwähnt, auf eine unspezifische Reaktion des Organismus hinweist, da der Spender maximal nur vier verschiedene inkompatible Antigene aufweisen kann.

Bei Transfusionen ist die Wahrscheinlichkeit einer Inkompatibilität bedeutend größer als bei einer Schwangerschaft. Trotz eines potentiellen Antigenstimulus kann es aber auch zu einem Verlust der Antikörper kommen, wie sich bei auffallend vielen Frauen zeigte, die zwischen den Untersuchungen schwanger waren und 1976 keine Antikörper mehr aufzeigen. Dabei wird mit 50% Wahrscheinlichkeit bei der zweiten Schwangerschaft der gleiche Haplotyp des Vaters vererbt, so daß es zu einer Restimulation kommen kann. Sind schon durch mindestens zwei Schwangerschaften beide Haplotypen vererbt, so stellt jede weitere eine Restimulation dar (15). Der Verlust der Antikörper trotz zwischenzeitlicher Schwangerschaft spricht für eine Toleranzbildung oder, wie oben erwähnt, für bestimmte Voraussetzungen, an die eine Persistenz geknüpft ist. Auch wenn in den 3 - 4 Jahren zwischen beiden Untersuchungen kein Antigenstimulus nachweisbar ist (laut Anamnese), kommt es in 50% der Fälle zu einer Verbreiterung des Antikörperspektrums, d.h. das Serum reagiert mit mehr unterschiedlichen Antigendeterminanten als vor 4 Jahren. Dabei konnten wir vor allem Spezifitäten gegen Antigene derselben kreuzreagierenden Gruppe nachweisen, der das Antigen, gegen das seinerzeit Antikörper entstanden sind, angehört. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem von Payne (75), wonach mit zunehmender Zeit nach der letzten Schwangerschaft die Spezifität enger wird. Unsere Ergebnisse sprechen für die These eines wiederholten Antigenkontaktes im Sinne einer Boosterung.

Auffallend ist, daß einzelne Antikörperspezifitäten mit unterschiedlicher Häufigkeit persistieren. Bei einem Vergleich der Persistenzquoten ergibt sich die Schwierigkeit, daß nicht alle Spezifitäten in unserem Untersuchungsgut gleich häufig vertreten sind. So sind vor allem Antikörper gegen Merkmale des A-Locus seltener als solche gegen Merkmale des B-Locus, was sich durch die größere Antigenität des B-Locus erklären läßt. Hinsichtlich der Persistenz

läßt sich jedoch keine statistisch signifikante Häufung der Antikörper gegen Merkmale des B-Locus nachweisen. Wir können bei unseren Berechnungen über die Spezifitäten, die zu selten vorkommen, keine fundierte Aussage über die Tendenz zur Persistenz abgeben.
Statistisch signifikant gehäuft persistieren die Antikörper B 17 und B 8, während B 12 und Bw 15 auffallend selten nach 3 - 4 Jahren im Serum noch zu finden sind. Eine gehäufte Persistenz von Antikörpern gegen A 2, wie Tongio (98) es in 24 Fällen fand, konnten wir nicht bestätigen. Als Erklärung für die verschiedenen Häufigkeiten der Persistenz nehmen wir eine unterschiedliche Antigenität an, so daß die Wahrscheinlichkeit, daß ein erneuter Antigenkontakt ein Stimulus, eine Boosterung darstellt, für die einzelnen Antigene verschieden groß ist. Nymand (71) schreibt den Antigenen des B-Locus allgemein eine größere Antigenität zu, und Bertrams (11) konnte eine unterschiedliche Antigenität der einzelnen Merkmale bzgl. der Bildung cytotoxischer und agglutinierender Antikörper feststellen. Bei dem Vergleich der Persistenzhäufigkeit mit der Antigenität, die von B. Brunner 1972 für die einzelnen Antigene berechnet wurde, läßt sich keine positive Korrelation feststellen, tendenzmäßig sogar eher eine negative Korrelation. Die Spezifitäten, die relativ oft persistieren, haben meist eine geringe Antigenität.

4.3.4. Antikörpertiter: Bei den 35 antikörperpositiven Seren untersuchten wir die vorhandene Titerstärke der persistierenden Antikörper und fanden in 1/3 der Fälle einen Titer von 1:4 bis 1:8, für Testseren also durchaus geeignet. Ein Vergleich der Titer mit denen von 1971/72 ist aufgrund dieser damals nicht durchgeführten Untersuchung nicht möglich, hätte auch in Bezug auf die Persistenz keine Aussagekraft, da die Höhe eines vorliegenden Titers keine Prognose über die Tendenz zuläßt (98). Relativ niedrige Titer werden von Hoppe (38) beschrieben, wobei der Titer nach Cohen (19) mit 45 - 65 Jahren abfällt.

4.4. Konsequenzen der Antikörperpersistenz.

Es stellt sich die Frage, ob der Verbleib von Antikörpern im Serum über Jahre hinweg für die Mutter und im Fall einer erneuten Schwangerschaft für den Foeten negative Auswirkungen nach sich ziehen kann.
Nach unseren Ergebnissen kommt es bei sensibilisierten Frauen in 1/3 der Fälle zu einer Persistenz von HLA-Antikörpern über mindestens 3 - 4 Jahre. Gleichzeitig läßt sich anhand der 334 Schwangerschaften bei den 105 Frauen ein durchschnittlicher Abstand von fast 3 Jahren zwischen zwei Schwangerschaften errechnen. Nach diesen Überlegungen müßte bei Frauen nach Auftreten einer Sensibilisierung im HLA-System theoretisch jeder dritte Foet mit einem sensibilisierten Organismus konfrontiert werden.

4.4.1. Konsequenzen für die Mutter.

HLA-Antikörper können für die Mutter in folgenden Situationen klinische Konsequenzen haben:

a) Bei Organtransplantationen
b) Bei Bluttransfusionen

In diesen Fällen kann es beim Vorliegen einer Sensibilisierung zu Abwehrreaktionen kommen, bei Transfusionen zu nichthämolytischen Reaktionen, die besonders bei Multiparae während der ersten Jahre nach der letzten Entbindung auftreten. Sie lassen sich vermeiden, indem man gewaschene Erythrozyten-Konzentrate verabreicht.

4.4.2. Konsequenzen für das Kind.

Über die klinische Bedeutung schwangerschaftsinduzierter HLA-Antikörper für das ungeborene Kind liegen widersprüchliche Angaben vor. Fest steht, die Antikörper gehören vorwiegend der IgG Klasse der Immunglobuline an und sind da-

mit placentagängig, was auch durch das Auftreten der Antikörper im Nabelschnurblut bestätigt wird.
Der Verdacht auf einen Einfluß von HLA-Antikörpern auf die Aborthäufigkeit wurde schon 1959 von van Rood (82) geäußert. Kessler (43) konnte diesen Verdacht verifizieren. Unter 200 Schwangeren, die in 30% Isoantikörper aufweisen, fand er 50 Schwangere mit Aborten und Frühgeburten. Diese 50 Schwangeren zeigten zu 60% eine seropositive Reaktion und damit eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten von Antikörpern und der Abortenhäufigkeit. Hinsichtlich der Frühgeburten konnte auch Jensen (39) eine signifikante Erhöhung bei HLA-Sensibilität beobachten. Ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen cytotoxischer Antikörper und Aborten lehnt er aber ebenso wie viele andere Autoren ab (1, 40, 72, 86). Das antigene Substrat der leukozytären Antikörper kommt fast im gesamten Organismus vor, sodaß durch Absorptionsvorgänge eine große Eliminationsquote zustande kommt, die das Ausbleiben von Schäden bewirken könnte. Es ist also denkbar, daß die HLA-Antikörper keine pathogenen Auswirkungen haben.

Trotz der allgemeinen Ablehnung eines Zusammenhanges haben wir unser Untersuchungsgut auf den pathogenetischen Einfluß von cytotoxischen Antikörpern auf einen nachfolgenden Abort untersucht.
Wir verglichen die 24 anamnestisch bekannten Aborte bei 312 Schwangerschaften, die vor dem Nachweis einer HLA-Sensibilisierung auftraten, mit den 6 Aborten von 21 Schwangerschaften, vor deren Konzeption eindeutig eine HLA-Sensibilisierung festgestellt wurde. Diese Einteilung ist notwendig, da wir davon ausgehen müssen, daß die Schwangerschaften und damit auch die Aborte vor dem Nachweis der Sensibilisierung nicht unter dem Einfluß eines sensibilisierten Organismus stattgefunden haben. Jedoch ist es gut möglich, daß ein Teil der Frauen, vor allem Mehrgebärende,

schon durch frühere Schwangerschaften sensibilisiert wurden, daß also der eine oder andere Abort schon unter den Bedingungen einer Sensibilisierung stattgefunden hat. Sind diese Überlegungen auch rein spekulativer Art, so unterstreichen sie doch folgende Ergebnisse:
Wir fanden, daß es bei Bestehen einer HLA-Sensibilisierung vor einer Schwangerschaft zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Abortenrate kommt. Dabei sind wir uns bewußt, eine unbemerkte Abstoßung der Frucht in einem frühen Stadium der Schwangerschaft nicht erfaßt zu haben.

Angeregt durch eine Arbeit von Johanson (42), der berichtet, daß es bei männlichen Geburten in einer signifikant höheren Anzahl zu einer Sensibilisierung im HLA-System kommt als bei weiblichen Geburten, ordneten wir die Geburten unserer 105 Fälle dem Geschlecht zu.
Obwohl uns nur die Anamnesen der Frauen, bei denen eine Sensibilisierung eingetreten ist, vorliegen, eine Erhebung im Sinne eines repräsentativen Querschnitts also nicht möglich ist, untersuchten wir die 105 Fälle, vergleichbar einem Längsschnitt, auf Veränderungen des Verhältnisses von weiblichen und männlichen Geburten. Vor dem Nachweis der HLA-Sensibilisierung bestand ein fast ausgewogenes Verhältnis. Für die Geburten nach erwiesener Sensibilisierung besteht dagegen ein Geschlechtsverhältnis von 10:4 zugunsten der männlichen Geburten. Die Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses stimmt in der Tendenz mit den Ergebnissen von Johanson überein, eine Signifikanz läßt sich jedoch nicht aufweisen.
Unsere Ergebnisse lassen sich auch als ein Überlebensvorteil für männliche Foeten bei Vorliegen von HLA-Antikörpern im Serum der Mutter deuten, da vor allem männliche Geburten unter derartigen Bedingungen auftreten. Es fehlen uns jedoch weitere Hinweise für eine derartige Hypothese, außerdem liegen uns nur 14 Fälle vor.

Bis zur endgültigen Klärung der Frage, ob eine HLA-Sensibilisierung für das Kind negative Folgen hat, sollte man bei Frauen im gebärfähigen Alter, wenn möglich, eine Sensibilisierung vermeiden.
In diesem Sinne sind auch Arbeiten über die Prophylaxe und Therapie einer HLA-Sensibilisierung zu verstehen. Auf der einen Seite kann man durch gezielte Hämosubstitution, indem man, wenn möglich, leukozyten- und thrombozytenarme Erythrozytenkonzentrate verabreicht, versuchen, das Risiko einer Sensibilisierung herabzusetzen (8). Auf der anderen Seite versucht man, die Sensibilisierung durch Verabreichung von Immunglobulinen zum Zeitpunkt der Geburt zu verhindern (37).

So rapide der Fortschritt in den letzten 10 Jahren gerade im Bereich der Histokompatibilitätsantigene war, zeigen doch die hier im Rahmen der Antikörperpersistenz angeschnittenen Fragen, daß bestimmte Problemstellungen noch einer endgültigen Abklärung bedürfen, da über Zusammenhänge zwischen genetischen Mechanismen und klinischen Befunden verschiedenste Theorien existieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Von 105 Frauen mit definierbaren cytotoxischen HLA-Antikörpern weisen nach 3 - 4 Jahren noch 34 (32 %) Antikörper im Serum auf. In einem Drittel dieser Fälle konnten wir noch einen Titer zwischen 1 : 4 und 1 : 8 nachweisen. Da Schwangerenseren auch heute noch die Hauptquelle für Reagentien zur Typisierung im Rahmen von Organtransplantationen darstellen, sind diese Ergebnisse für die Praxis der HLA-Serologie von Bedeutung. Es lohnt sich, bei Antikörperträgerinnen, von denen vor 3 - 4 Jahren qualitativ gute Seren gewonnen worden waren, nochmals das Serum auf Antikörper zu untersuchen. Durchschnittlich 11 % weisen auch nach dieser Zeit noch Antikörper auf, die hinsichtlich Spezifität und Titerstärke für Testzwecke verwertbar sind.

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß folgende Faktoren einen Einfluß auf die Häufigkeit der Persistenz cytotoxischer Antikörper haben, beziehungsweise folgende Veränderungen durch das Vorliegen einer Persistenz auftreten.

1) Mit steigender Anzahl an Schwangerschaften und zunehmendem Alter der Mutter steigt der Prozentsatz an Seren mit einer Persistenz der Antikörper.

2) Zwei Drittel der antikörperhaltigen Seren weisen im Verhältnis zu vor vier Jahren ein verbreitertes Antikörperspektrum auf, sind also unspezifischer geworden. Die Verbreiterung des Spektrums beschränkt sich dabei meist auf die kreuzreagierende Gruppe.

3) Bei Frauen mit persistierenden Antikörpern von multispezifischem Charakter fanden wir durchschnittlich eine höhere Anzahl an Schwangerschaften als bei Frauen mit monospezifischen, persistierenden Antikörpern.

4) Ein zwischenzeitlicher Antigenkontakt in Form einer Transfusion bewirkt eine Veränderung der Antikörperspezifität in Richtung Multispezifität. Uns fiel auf, daß trotz erneuter Schwangerschaft bei nachgewiesener Sensibilisierung häufig mit einem Verlust der Antikörper zu rechnen ist.

5) Die einzelnen Antikörperspezifitäten persistieren unterschiedlich häufig. B 17 und B 8 zeigen eine statistisch signifikant erhöhte Persistenzhäufigkeit, B 12 und Bw 15 persistieren auffallend selten. In der Tendenz weisen die Antikörper des B-Locus eine vermehrte Persistenz gegenüber denen des A-Locus auf, die jedoch statistisch nicht signifikant ist.

6) Wir konnten nachweisen, daß es bei Vorliegen einer Sensibilisierung im HLA-System zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Abortenrate kommt.

7) Durch das Auftreten einer Sensibilisierung verschiebt sich das Geschlechtsverhältnis zugunsten der männlichen Foeten.

Aufgrund mehrerer Hinweise aus unseren eigenen Ergebnissen und aus der Literatur halten wir es für wahrscheinlich, daß die jahrelange Persistenz von Antikörpern auf wiederholten, teils nicht eruierbaren Antigenstimuli beruht. Dabei scheint es, daß nicht bei jeder Frau ein erneuter Antigenkontakt auch zu einer Boosterung führt, sondern daß bestimmte Voraussetzungen dazu notwendig sind.
Ein Vergleich des HLA-Systems mit dem Rh-System macht deutlich, daß trotz gewisser Parallelen gravierende Unterschiede in Ablauf und Häufigkeit der Sensibilisierung, in Art und Nachweis der Antikörper und in der klinischen Relevanz vorliegen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1 AHRONS, S.: HL-A antibodies: influence on the human foetus. Tissue Antigens I, 121 - 128, (1971).

2 AHRONS, S.: Leukocyte antibodies: occurence in primigravidae. Tissue Antigens I, 178 - 183, (1971).

3 AHRONS, S. and S. GLAVIND-KRISTENSEN: Cytotoxic HL-A antibodies: immunglobulin classification. Tissue Antigens I, 129 - 136, (1971).

4 AHRONS, S. and E. THORSBY: Cytotoxic HL-A antibodies: studies of synergism and gene-dose effect. Vox sang. 18, 323 - 333, (1970).

5 ALBERT, E.D.: Die klinische Bedeutung der Gewebsantigene (HL-A) des Menschen. Münch. med. Wschr. 118, 619 - 624, (1976).

6 ALBERT, E.D.: Welche Bedeutung haben Bluttransfusionen für die Prognose der Nierentransplantationen? Vorgetragen beim Kongreß der Dtsch. Gesellschaft für Bluttransfusion und Immunhämatologie, Frankfurt, April 1976.

7 AMOS, D.B.: Human histocompatibility locus HL-A. Science 159, 659 - 660, (1968).

8 BACHNER, U., N. MÜLLER, W. STOLP und H. EGLI: Zur Bedeutung von HL-A-Antikörpern im Serum geschlechtsreifer Frauen. 5. Internat. Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde e.V., Amsterdam, 69-75, (1973).

9 BERTRAMS, J. and E. KUWERT: Leukozyten - Isoantikörper: Ausbildung, Spezifitätsänderungen und Persistenz der Antikörper bei Frauen (in Abhängigkeit von Schwangerschaft und Geburt). Münch. med. Wschr. 30, 1386 - 1391, (1970).

10 BERTRAMS, J., E. KUWERT und G. LINZENMEIER: Leukozyten-Isoantikörper: Vorkommen agglutinierender und cytotoxischer Antikörper gegen weiße Blutzellen im Serum erst- und mehrgebärender Frauen.
Dtsch. med. Wschr. 95, 1145 - 1152, (1970).

11 BERTRAMS, J., E. KUWERT und H. H. LOHMEYER: Die Spezifität von Leukozytenisoantikörpern zur Histokompatibilitätsbestimmung im Serum von Primi- und Multiparae.
Bibl. haemat. 37, 98 - 106, (1971).

12 BODMER, W. F., BODMER, J., S. ADLER, R. PAYNE and J. BIALEK: Genetics of 4 and LA human leukocyte groups.
Ann. N. Y. Acad. Science 129, 473, (1966).

13 BODMER, W. F., J. G. BODMER and M. TRIPP: Recombination between the LA and 4 loci of the HL-A system.
Histocompatibility Testing 1970, 187 - 191, Copenhagen: Munksgaard (1970).

14 BRAND, D. L., J. G. RAY, D. B. HARE, D. E. KAYHOE and J. D. Mc CLEEAND: Preliminary trials toward standarization of leukocyte typing.
Histocompatibility Testing 1970, 357 - 367, Copenhagen: Munksgaard (1970).

15 BRUNNER, B.: Nachweis und Bedeutung von HL-A Antikörpern bei Schwangeren.
Med. Inaugural-Dissertation, Tübingen 1974.

16 CEPPELLINI, R., GD. BONNARD, F. COPPO, V. C. MIGGIANO, M. POSPISIL, E. S. CURTONI and M. PELLEGRINO: Mixed leukocyte cultures and HL-A antigens I. Reactivity of young fetuses newborns and mothers at delivery.
Transplantation Proc. 3, 58, (1971).

17 CEPPELINI, R., E.S. CURTONI, P.L. MATTIUZ, V. MIGGIANO, G. SCUDELLER and A. SERRA: Genetics of leukocyte antigens: a family study of segregation and linkage.
Histocompatibility Testing 1967, 149, Copenhagen: Munksgaard (1967).

18 CEPPELINI, R., P.L. MATTIUZ, G. SCUDELLER and M. VISETTI: Experimental allotransplantation in man I. The role of the HL-A system in different genetic combinations.
Transplantation Proc. I, 385, (1969).

19 COHEN, E. and D.L. SACKETT: Persistence and significance of leukocyte antibodies induced by pregnancy.
Bibl. haemat. (Basel), 38, 311 - 315, (1971).

20 D' AMARO, J., A. VAN LEEUWEN, A. SVEJGAARD and J.J. VAN ROOD: The micro complement fixation test II: Serologic and complement studies.
Histocompatibility Testing 1970, 539 - 542, Copenhagen: Munksgaard (1970).

21 DAUSSET, J.: Leucoagglutinins IV. Leucoagglutinins and blood transfusion.
Vox sang. 4, 190 - 198, (1954).

22 DAUSSET, J.: Iso-leuco-anticorps.
Acta haemat. Basel 20, 156, (1958).

23 DAUSSET, J., P. IVANYI and D. IVANYI: Tissue alloantigens in humans: identification of a complex system (Hu-1).
Histocompatibility Testing 1965, 51 - 62, Copenhagen: Munksgaard (1965).

24 DAUSSET, J., F.T. RAPAPORT, L. LEGRAND, J. COLOMBANI and A. MARCELLI-BARGE: Skin allograft survival in 238 human subjects. Role of specific relationships at the four gene sites of the first and second HL-A loci.
Histocompatibility Testing 1970, 381 - 397, Copenhagen: Munksgaard (1970).

25 DESAI, R.G. and W.P. CREGER: Maternofetal passage of leukocytes and platelets in man.
Blood 21, 665 - 673, (1963).

26 DESAI, R.G., E. Mc CUTCHEON, B. LITTLE and S.G. DRISCOLL: Fetomaternal passage of leukocytes and platelets in erythroblastosis fetalis.
BLood 27, 858, (1966).

27 DOAN, C.A.: The recognition of a biologic differentiation in the white blood cells.
J. amer. med. Ass. 86, 1593 - 1597, (1926).

28 DOUGHTY, R.W. and K. GELSTHORPE: An initial investigation of lymphocyte antibody activity through pregnancy and in eluates prepared from placental material.
Tissue Antigens 4, 291 - 298, (1974).

29 ENGELFRIET, C.P.: Signifikanz und mögliche Erklärung der Kreuzreaktion.
5. Internat. Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde e.V. Amsterdam, 33 - 41, (1973).

30 ENGELFRIET, C.P. and A. BRITTEN: Cytotoxic antibodies against leucocytes.
Vox sang. 11, 338 - 344, (1966).

31 FOTINO, M., E.J. MERSON, P. BENOIT, A.W. ROWE, F.H. ALLEN jr.: Lymphocyte typing by simplified microcytotoxicity test using frozen and thawed cells.
Histocompatibility Testing 1967, 429, Copenhagen: Munksgaard (1967).

32 GAGLIERO, L.: Maternal sensitization to foetal erythrocyte, leukocyte and platelet antigens during pregnancy.
Proc. 9th. Congr. int. Soc. Blood Tranf., Mexico 1962, 763 - 767, (1964).

33 GOODSMANN, H. S., and L. MASAITIS: Analysis of isoimmune response to leucocytes I. Maternal cytotoxic response to fetal lymphocyte.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 126, 599, (1967).

34 GRAW, R. G. jr., I. M. GOLDSTEIN, H. J. EYRE and P. J. TERASAKI: Histocompatibility testing for leucocyte transfusion. Lancet II, 77 - 79, (1970).

35 HAMMOND, D., P. MATTIUZ and E. S. CURTONI: Developement of cytotoxic antibody against human leukocytes by transfusion from selected donors.
Histocompatibility Testing 1967, 325 - 337, Copenhagen: Munksgaard (1967).

36 HAMPERL, H.: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie.
Berlin, Heidelberg, New York, Springer (1974).

37 HARRIS, R. and M. B. MACAULAY: Prevention of leucocyte-antibody formation.
Lancet, March 14, 544 - 545, (1970).

38 HOPPE, I.: Schwangerschaftsinduzierte Leukozyten- (HL-A-) Antikörper.
Arch. Gynäk. 215, 199 - 214, (1973).

39 JENSEN, K. G.: Leucocyte antibodies in serum of pregnant women.
Vox sang. 9, 315 - 332, (1964).

40 JENSEN, K. G. and H. ABILDGAARD: The influence of maternal leucocyte antibodies on infants.
9th. Congr. int. Soc. Blood Transf., Mexico 1962, 759 - 762, (1964).

41 JOHANNSEN, R.: Zum Vorkommen von löslichen HLA-Substanzen in Humanplasmaprotein-Fraktionen. Vorgetragen beim Kongreß der Dt. Gesellschaft für Bluttransfusion und Immunhämatologie, Frankfurt 1976.

42 JOHANSEN, K. and H. FESTENSTEIN: Maternal HL-A Antibodies and fetal sex. British Medical Journal 4, 202 - 203, (1974).

43 KESSLER, M. und J. SCHNEIDER: Agglutinierende Leukozytenantikörper während der Schwangerschaft. Bibl. haemat. (Basel) 37, 107 - 112, (1971).

44 KISSMEYER-NIELSEN, F. and E. KJERBYE: Lymphocytotoxic microtechnique. Purifikation of lymphocytes by flotation. Histocompatibility Testing 1967, 381 - 383, Copenhagen: Munksgaard (1967).

45 KISSMEYER-NIELSEN, F., L. STAUB NIELSEN, A. LINDHOLM, L. SANDBERG, A. SVEJGAARD and E. THORSBY: The HL-A system in relation to human transplantations. Histocompatibility Testing 1970, 105 - 137, Copenhagen: Munksgaard (1970).

46 KISSMEYER-NIELSEN, F., A. SVEJGAARD, S. AHRONS and L. STAUB NIELSEN: Crossing-over within the HL-A system. Nature 224, 75 - 76, (1969).

47 KUWERT, E. und J. BERTRAMS: Die Bedeutung des HL-A-Antigensystems für die Tumorforschung. Z. Krebsforschung 78, 204 - 218, (1972).

48 LAMM, L.U., F. KISSMEYER-NIELSEN, A. SVEJGAARD et al.: On the orientation of the HL-A region and the PGM3 locus in the chromosom. Tissue Antigens II, 3, 205 - , (1972).

49 MANN, D.L. and J.L.FAHEY: Properties of HL-A alloantigens solubilized by chemical techniques.
Transplantation Proc. 3, 234 - 236, (1971).

50 MANN, D.L., G.N.ROGENTINE, jr. and J.L.FAHEY: Molecular heterogeneity of human lymphoid (HL-A) alloantigens. Scince 163, 1460 - 1462, (1969).

51 MAYR, W.R.: Serologie der Organtransplantation. Sonderdruck aus: Das Med. Laboratorium XXIII, 145 - 153, (1970).

52 MAYR, W.R.: Die Genetik des HLA-Systems. Populations- und Familienuntersuchungen, unter besonderer Berücksichtigung der Paternitätsserologie.
Humangenetik 12, 195 - 243, (1971).

53 MAYR, W.R.: Kreuzreagierende Antikörper im Bereich des HL-A-Systems der Transplantationsantigene.
Schweiz. med. Wschr. 101, 361 - 363, (1971).

54 MAYR, W.R.: Serologie der Organtransplantation. Sonderdruck aus : Das Med. Laboratorium XXV, 97 - 102, (1972).

55 MAYR, W.R.: Leukozytäre Isoantigene des Menschen mit ausführlicher Beschreibung des HL-A Systems.
Fortschritt der Hämatologie Bd. 3, E. Perlick, W. Plenert, O. Prokop. Hrsg. Barth Leipzig, 17 - 62, (1973).

56 MAYR, W.R.: Verteilung der HL-A Merkmale in SW-Deutschland und Vergleich der HL-A Genfrequenz einiger Populationen der weißen Rasse.
Anthrop. Anz. (1973).

57 MAYR, W.R.: Der HLA Genkomplex.
Vorgetragen beim Kongreß der Dtsch. Gesellschaft für Bluttransfusion und Immunhaematologie, Frankfurt, April 1976.

58 MEDEWAR, P.B.: Immunity to homologous grafted skin II.
The relationship between the antigens of blood and skin.
Brit. J. exp. Path 27, 15, (1946).

59 MEMPEL, W.: MLC-Determinanten und ihre Bestimmung.
Vorgetragen beim Kongreß der Dtsch. Gesellschaft für Bluttransfusion und Immunhämatologie, Frankfurt, April 1976.

60 METCHNIKOFF, E.: Etudes sur la résorption des cellules.
Ann. Inst. Pasteur 13, 737 - 765, (1899).

61 MICKEY, M.R., M.KREISLER, E.D.ALBERT, N.TANAKA and P.J.TERASAKI: Analysis of HL-A incompatibility in human renal transplants.
Tissue Antigens I, 57 - 57, (1971).

62 MINEV, M.: Differences in the immunogenicity of the HL-A antigens.
Vox sang. 29, 433 - 439, (1975).

63 MITTAL, K.K., R.D.ROSSEN and W.F. BUTLER: Evaluation of HL-A serum specifity and lymphocyte reactivity.
Histocompatibility Testing 1970, 343 - 349, Copenhagen: Munksgaard (1970).

64 MITTAL, K.K. and P.J.TERASAKI: Cross-reactivity in the HL-A system.
Tissue Antigens 2, 94 - 104, (1972).

65 MIYAJIMA, T., A.A.HIRATA and P.J.TERASAKI: Escape from sensitization of HLA-antibodies.
Tissue Antigens 2, 64 - 73, (1972).

66 MOESCHLIN, S. und J. WAGNER: Leukoagglutinine als Ursache von Agranulozytosen (Pyramidosen usw.). Schweiz. med. Wschr. 82, 1104 - 1107, (1952).

67 MORTEN, J. A., M. M. PICKLES, L. SUTTON and F. SKOV: Identifikation of further antigens on red cells and lymphocytes. Association of Bg b with W17 (Te57) and Bg c with W28 (Da15, Ba). Vox sang. 21. 141, (1971).

68 MURRAY, S. and P. J. DEWAR: Incidence of lymphocytotoxic antibody in maternal serum at delivery, in cord serum and placental fluid. Vox sang. 30, 291 - 294, (1976).

69 NAITO, S., M. R. MICKEY, A. J. EBBIN, J. STRAUSS and P. J. TERASAKI: Fetal maternal incompatibility II. Direct cross-match studies on 38 children with birth defects. Histocompatibility Testing 1970, 489 - 494, Copenhagen: Munksgaard (1970).

70 NIELSEN, L. S. and A. SVEJGAARD: HL-A immunisation and HL-A types in pregnancy. Tissue Antigens 2, 316 - 327, (1972).

71 NYMAND, G.: Complement fixing and lymphocytotoxic antibodies in serum of pregnant women at delivery. IV. Serology. Vox sang. 28, 34 - 41, (1975).

72 NYMAND, G.: Complement fixing and lymphocytotoxic antibodies in serum of pregnant women at delivery II. Clinical observation I. Vox sang. 28, 101 - 109, (1975).

73 OH, J. H. and L. D. MACLEAN: Comparative immunogenicity of HL-A antigens: a study in primiparas. Tissue Antigens 5, 33 - 37, (1975).

74 OVERWEG, J. and C. P. ENGELFRIET: Cytotoxic leukocyte iso-antibodies formed during the first pregnancy.
Vox sang. 16, 97 - 104, (1969).

75 PAYNE, R.: The developement and persistence of leuko-agglutinins in parous women.
Blood 19, 411 - 424, (1962).

76 PAYNE, R. and M. R. ROLFS: Fetomaternal leukocyte incompatibility.
J. clin. Invest. 37, 1756 - 1763, (1958).

77 PAYNE, R., M. TRIPP and J. WEIGLE: A new leukocyte isoantigen system in man.
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 29, 285 - 295, (1964).

78 ROOD, J. J. van: Leukocyte grouping.
Med. Diss. Leiden, (1962).

79 ROOD, J. J. van: The HL-A system: genetics, (patho) physiology and clinical relevance.
5. Internat. Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenmerkmale e. V., 9 - 30, (1975).

80 ROOD, J. J. van, J. G. EERNISSE and A. van LEEUWEN: Leukocyte antibodies in sera from pregnant women.
Nature 181, 1735 - 1736, (1958).

81 ROOD, J. J. van and A. van LEEUWEN: Leukocyte grouping: a method and its application.
J. clin. Invest. 42, 1382 - 1389, (1963).

82 ROOD, J. J. van, A. van LEEUWEN and J. G. EERNISSE: Leukocyte antibodies in sera of pregnant women.
Vox sang. 4, 427 - 444, (1959).

83 ROOD, J.J. van, A. van LEEUWEN and R. ZWEERUS: The 4a and 4b antigens. Do they or don't they?
Histocompatibility Testing 1970, 93 - 103, Copenhagen: Munksgaard (1970).

84 SAVI, M., G. GARINI and M. BONINI: Permanenza di anticorpi linfocitotossici in donne poligravide esaminate a distanza dal parto.
Ateneo Parmense, Acta Bio. Med., 46, 61 - 76, (1975).

85 SCHUNTER, F.: Das HL-A System: Genetik, Serologie und Anwendung.
Schriftliche Mitteilung.

86 SEVER, J.L. and P.J. TERASAKI: Maternal-fetal incompatibility III. Central nervous system and cardiac anomalies.
Histocompatibility Testing 1970, 495 - 500, Copenhagen: Munksgaard (1970).

87 SHULMAN, N.R., V.J. MARDER, L.M. ALEDORT and M.C. HILLER: Complement-fixing isoantibodies against antigens common to platelets and leukocytes.
Proc. 9th. Congr. int. Soc. Blood Transf., Mexico 1962, 439 - 447, (1964).

88 SINGAL, D.P., D.P.S. SENGAR and P.J. TERASAKI: Detection of non - HL-A antibodies.
Histocompatibility Testing 1970, 231 - 236, Copenhagen: Munksgaard (1970).

89 SPEISER, P.: Das HL-A System im Paternitätsprozeß mit Berücksichtigung des Beweiswertes.
5. Internat. Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde e.V., 273 - 280, (1973).

90 SPIELMANN, W. und S. SEIDL: Einführung in die Immunhämatologie und Transfusionskunde.
Weinheim, Verlag Chemie, 1972.

91 STOLP, W., U. BACHNER, N. MÜLLER und J. SCHNEIDER: Hat das Histokompatibilitäts-System eine Bedeutung für die weibliche Sterilität ?
Fortschr. Med. 91, 1055 - 1058, (1973).

92 SVEJGAARD, M.: Cross-reactive human HL-A iso-antibodies.
Nature 219, 868 - 869, (1968).

93 TANIGAKI, N. and D. PRESSMAN:
Transplant. Rev. 21, 15, (1974).

94 TERASAKI, P. J. and J. D. Mc CLELLAND: Microdroplet assay of human serum cytotoxins.
Nature, London 204, 998 - 1000, (1964).

95 THORSBY, E. and R. KISSMEYER-NIELSEN: HL-A antigens and genes III. Production of HL-A typing antisera of desired specificity.
Vox sang. 17, 102 - 111, (1969).

96 THORSBY, E., K. E. KJERBYE and A. BRATLIE: Cross-reactive HL-A antibodies: Absorption and immunization studies.
Vox sang. 18, 373 - 378, (1970).

97 TONGIO, M. M., A. BERREBI and S. MAYER: A study of lymphocytotoxic antibodies in multiparous women, having at least four pregnancies.
Tissue Antigens 2, 378 - 388 (1972).

98 TONGIO, M.M., A. BERREBI, B. PFEIFFER and S. MAYER: Serological studies on lymphocytotoxic-antibodies in primiparous women.
Tissue Antigens 1, 243 - 257, (1971).

99 TONGIO, M.M. and S. MAYER: Transfer of HL-A antibodies from the mother to the child.
Transplantation 20, 163 - 164, (1975).

100 WAERDEN, B.L. van der: Mathematische Statistik.
Berlin, Göttingen, Heidelberg. Springer 1957.

101 WALFORD, R.L.: The isoantigenic system of human leukocytes.
Series Haemat. II, 2, 1 - 90, (1969).

102 WALKNOWSKA, J., F.A. CONTE and M.M. GRUMBACH: Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer.
Lancet I, 1119 - 1122, (1969).

103 WHO-iuis terminology Committee - Nomenclature for factors of the HLA system.
Histocompatibility Testing 1975, 5 - 12, Copenhagen: Munksgaard (1975).

104 WORKING PARTY on the exchange of sera for determination of histocompatibility.
Fifth meeting Paris, March 1974.

105 ZMIJEWSKI, C.M., H.E. ZMIJEWSKI and H.C. HUNEYCUTT: The relationship of the frequencies of white cell antibodies and red cell antibodies in the sera of multiparous women.
Int. Arch. Allergy 32, 574 - 582, (1967).

Für die Themenstellung und die stetige Bereitschaft, sich mit meiner Arbeit auseinanderzusetzen, Anregung und Anleitung zu vermitteln, möchte ich Herrn Professor Dr. W. Schneider aufrichtig danken.
Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. D. Möller, welche mir besonders bei der experimentellen Ausführung stets hilfreich zur Seite stand.

LEBENSLAUF

Am 19.3.1953 wurde ich, Heimo Gerhard Haug, als Sohn des Gerhard Haug und der Herta Haug, geborene Stelzel, in Calw im Schwarzwald geboren.

Ostern 1960 wurde ich eingeschult und bestand nach 13 Schuljahren am 16.6.1972 die Reifeprüfung am Hermann-Hesse-Gymnasium in Calw.

Mit dem Wintersemester 1972/73 wurde ich zum Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zugelassen.

Im August 1974 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, ein Jahr später den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Kurz danach begann ich mit der vorliegenden Arbeit.

Meine Famulaturen absolvierte ich bei einem Arzt für Allgemeinmedizin und in einer Chirurgisch-orthopädischen Klinik.

Am 18.10.1978 habe ich an der Universität Tübingen die ärztliche Prüfung abgelegt.